

Ce mémoire intitulé :

Analyse fonctionnelle de deux nouvelles mutations récessives de l'*AQP2*  
impliquées dans le diabète insipide néphrogénique par expression dans les  
ovocytes de *Xenopus laevis*

Présenté par :

Alexandre Leduc-Nadeau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Yves Lapointe, président-rapporteur

Dr Lucie Parent, membre du jury

Dr Daniel G. Bichet MD, directeur de recherche.

Université de Montréal

Analyse fonctionnelle de deux nouvelles mutations récessives de l'*AQP2*  
impliquées dans le diabète insipide néphrogénique par expression dans les  
ovocytes de *Xenopus laevis*

Par Alexandre Leduc-Nadeau

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

M.Sc. en physiologie

Juin 2009

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

© Alexandre Leduc-Nadeau

## Résumé

Le diabète insipide néphrogénique (DIN) autosomal peut être causé par les mutations du gène codant pour le canal à eau aquaporine-2 (AQP2). Un modèle couramment utilisé pour l'étude des protéines membranaires telle l'AQP2 est l'expression hétérologue dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Malheureusement, les techniques déjà existantes de purification de membranes plasmiques sont soit trop longues, trop difficiles ou demandent trop de matériel, ne permettent pas l'analyse adéquate du ciblage des formes sauvage comme mutantes, un élément crucial de ce type d'étude. Nous avons donc dans un premier temps mis au point une technique rapide et efficace de purification de membranes plasmiques qui combine la digestion partielle de la membrane vitelline, sa polymérisation à la membrane plasmique suivi de centrifugations à basse vitesse pour récolter les membranes purifiées. Nous avons utilisé cette technique dans l'étude de deux nouveaux cas familiaux de patients hétérozygotes possédant les mutations V24A et R187C dans un cas et K228E et R187C dans le second cas. Pour chaque mutation, nous avons analysé autant les éléments de fonctionnalité que les paramètres d'expression des protéines mutantes. Les expériences de perméabilité membranaire démontrent que les ovocytes exprimant AQP2-V24A ( $P_f = 16.3 \pm 3.5 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) et AQP2-K228E ( $P_f = 19.9 \pm 7.0 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) ont des activités similaires à celle exprimant la forme native ( $P_f = 14.4 \pm 5.5 \times 10^{-4}$  cm/s, 1 ng), tandis que AQP2-R187C ( $P_f = 2.6 \pm 0.6 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) ne semble avoir aucune activité comme ce qui est observé chez les ovocytes non-injectés ( $P_f = 2.8 \pm 1.0 \times 10^{-4}$  cm/s). Les études de co-expression ont démontré un effet d'additivité lorsque AQP2-V24A et -K228E sont injectées avec la forme native et un effet s'apparentant à la dominance négative lorsque AQP2-R187C est injecté avec la forme native, avec AQP2-V24A ou avec -K228E. Les résultats obtenus par immunobuvardage représente bien ce qui a été démontré précédemment, on remarque la présence des mutations K228E, V24A et la forme sauvage à la

membrane plasmique, contrairement à la mutation R187C. Cependant, lorsque les mutations sont exprimées dans des cellules mIMCD-3, il n'y a qu'une faible expression à la membrane de la forme –K228E et une absence totale des formes –V24A et –R187C à la membrane plasmique, contrairement à la forme native. Les résultats de nos études démontrent que tout dépendant du système d'expression les formes –K228E et –V24A peuvent être utiles dans l'étude des problèmes d'adressage à la membrane à l'aide de chaperonne chimique. De plus, la forme –R187C démontre des difficultés d'adressage qui devront être étudiées afin de mieux comprendre la synthèse des formes natives.

**Mots clés :** Ovocyte, aquaporine-2, diabète insipide néphrogénique, mutation,

## Abstract

The autosomal nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is caused by mutations of the gene coding for the water channel aquaporine-2 (AQP2). An oftenly used model for the study of membrane proteins such as AQP2 is the heterogenous expression in *Xenopus laevis* oocytes. Unfortunately, the existing techniques of plasma membranes purification are either too long, too difficult or require too much material, which does not allow adequate analysis of targeting of the native and mutants forms, which is crucial for this type of study. We developed a fast and effective plasma membrane purification technique which combines partial digestion of the vitellin membrane, its polymerization with the plasma membrane followed by a serie of low speed centrifugations to collect the purified membranes. We used this technique to study of two new family cases of heterozygote patients carrying the V24A and R187C mutations in a case and K228E and R187C in the second case. For each mutation, we analyzed the functionality and the parameters of expression of the mutant proteins. The membrane permeability experiments show that the oocytes expressing AQP2-V24A ( $P_f = 16.3 \pm 3.5 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) and AQP2-K228E ( $P_f = 19.9 \pm 7.0 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) have similar activities to the oocytes expressing the native form ( $P_f = 14.4 \pm 5.5 \times 10^{-4}$  cm/s, 1 ng), while AQP2-R187C ( $P_f = 2.6 \pm 0.6 \times 10^{-4}$  cm/s, 10 ng) doesn't seem to have any activity like the un-injected oocytes ( $P_f = 2.8 \pm 1.0 \times 10^{-4}$  cm/s). The coexpression studies showed an additive effect when AQP2-V24A and -K228E are injected with the native form and an effect being associated with negative dominance when AQP2-R187C was injected with AQP2-V24A, -K228E and the native form. Western blot results confirmed what was observed in the functionality studies. However, when the mutations were expressed in mIMCD-3 cells, there was a slight expression of the K228E mutation to the plasma membrane and a total absence of the mutations -V24A and R187C at the plasma membrane. The results of our

studies showed that depending on the expression system the mutations –K228E and -V24A can be used in targeting studies using chemical chaperones.

**Keywords:** Oocyte, Aquaporin-2, nephrogenic diabetes insipidus, mutation

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	V
<b>Tables des matières</b> .....	VII
<b>Abréviations</b> .....	XI
<b>Liste des figures</b> .....	XIV
<b>Liste des tableaux</b> .....	XV
<b>Remerciement</b> .....	XVI
<b>1. Introduction</b> .....	1
1.1 Anatomie rénal.....	1
1.1.1 Anatomie.....	1
1.1.1.1 Anatomie externe.....	1
1.1.1.2 Anatomie interne.....	1
1.1.2 Néphron.....	2
1.1.2.1 Corpuscule Rénal.....	3
1.1.2.2 Tubule rénal.....	3
1.1.2.3 Appareil juxta-glomérulaire.....	4
1.1.3 Vascularisation rénal.....	5
1.2. Physiologie Rénale.....	5
1.2.1 Filtration glomérulaire.....	6
1.2.2 Réabsorption tubulaire.....	6
1.2.3 Sécrétion tubulaire.....	7
1.2.4 Régulation de la concentration et du volume de l'urine.....	8
1.2.4.1 Multiplicateur à contre-courant.....	8
1.2.4.2 Échangeur à contre-courant.....	10
1.3 Réabsorption de l'eau par hormones.....	11
1.3.1 Hormone antidiurétique.....	11
1.3.1.1 Synthèse.....	12

1.3.1.2 Fonction.....	13
1.3.2 Récepteur de l'hormone antidiurétique.....	14
1.3.2.1 AVPR2.....	14
1.3.2.2.1 Structure.....	14
1.3.2.2.2 Fonction.....	15
1.3.2.2.3 Endocytose et désensibilisation.....	16
1.4 Diabète Insipide.....	17
1.4.1 DIN héréditaires liés au chromosome X.....	18
1.4.2 DIN autosomiques.....	19
1.5 Aquaporine.....	21
1.5.1 Structure générale.....	22
1.5.2 Spécificité du transport de l'eau.....	23
1.5.3 Classification.....	24
1.5.3.1 Aquaporine classique.....	26
1.5.3.1.1 AQP0.....	26
1.5.3.1.2 AQP1.....	26
1.5.3.1.3 AQP4.....	26
1.5.3.1.4 AQP5.....	27
1.5.3.2. Aquaglycéroporine.....	27
1.5.3.2.1 AQP3.....	27
1.5.3.2.2 AQP7.....	28
1.5.3.2.3 AQP9.....	28
1.5.3.2.4 AQP10.....	28
1.5.3.3 Aquaporine non-orthodoxe.....	29
1.5.3.3.1 AQP6.....	29
1.5.3.3.2 AQP8.....	29
1.5.3.3.3 AQP11.....	30
1.5.3.3.4 AQP12.....	30
1.5.4 AQP2.....	30
1.5.4.1 Synthèse.....	30



1.5.4.2 Transport intracellulaire.....	31
1.5.4.3 Exocytose à la membrane apicale.....	32
1.5.4.4 Endocytose et dégradation.....	34
1.5.4.5 Mutations.....	35
1.5.4.6 Mutants AQP2-V24A, AQP2-D150E, AQP2-R187C, AQP2-G196D et AQP2-K228E.....	37
1.6 <i>Xenopus Laevis</i> .....	40
1.6.1 Historique.....	40
1.6.2 Ovocytes.....	41
1.6.3 Techniques de purifications de membranes existantes.....	43
1.7 Objectifs.....	44
 <b>2. Résultats</b> .....	 46
2.1 « Elaboration of a novel technique for purification of plasma membrane form <i>Xenopus laevis</i> oocytes. ».....	46
2.1.1 Abstract.....	47
2.1.2 Introduction.....	48
2.1.3 Material and Methods.....	50
2.1.4 Results and Discussion.....	54
2.1.5 Acknowledgements.....	58
2.1.6 References.....	58
2.1.7 Legends.....	61
2.1.8 Figures.....	63
 2.2 « Autosomal recessive mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with apparent normal expression in <i>Xenopus</i> oocytes. ».....	 68
2.2.1 Abstract.....	69
2.2.2 Introduction.....	70
2.2.3 Material and Methods.....	72
2.2.4 Results.....	77

2.2.5 Discussion.....	83
2.2.6 References.....	90
2.2.7 Legends.....	93
2.2.8 Figures.....	96
 <b>3. Discussion.....</b>	 104
3.1 Premier article « Elaboration of a novel technique for purification of plasma membrane from <i>Xenopus laevis</i> oocytes. ».....	104
3.1.1 Mise en contexte.....	104
3.1.2 Considérations techniques.....	104
3.1.3 Avantages de la technique.....	105
3.1.4 Les limites de la technique.....	106
3.1.5 Validation de la technique.....	107
 3.2 Deuxième article « Autosomal recessive mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with apparent normal expression in <i>Xenopus</i> oocytes. ».....	 109
3.2.1 Mise en contexte.....	109
3.2.2 Trafic intracellulaire des AQP2.....	109
3.2.3 Phénotype des mutations AQP2-V24A, -R187C et -K228E.....	111
3.2.4 Phénotype des études de coexpression des formes mutées avec les formes natives.....	113
 <b>4. Conclusion et perspectives.....</b>	 115
 <b>Bibliographie.....</b>	 118

## Abréviations

3D	tridimensionnel
AA	acide aminé
AC	adénylate cyclase
ACTH	hormone corticotrope (adrenal cortico tropin hormone)
ADN	acide désoxyribonucléique
AKAP	PKA anchoring proteins
AQP	aquaporine (peut être de 1 à 12)
AQP2	aquaporine-2
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosien triphosphate
AVP	L-arginine-vasopressine, vasopressine, hormone antidiurétique
AVPR1a	récepteur 1a de l'arginine vasopressine
AVPR1b	récepteur 1b de l'arginine vasopressine
AVPR2	récepteur 2 de l'arginine vasopressine
AVPR3	récepteur 3 de l'arginine vasopressine
Br	brome
CHIP28	Channel-formaing Integral Protein of 28kDa
Cl	Chlore
cm	centimètre
CREB	cAMP response element binding protein
C-terminale	carboxy-terminale
DAG	diacylglycérol
dDAVP	1-désamino-8-D-arginine vasopressine, desmopressine

Del	délétion
DI	diabète insipide
DIC	diabète insipide central
DIN	diabète insipide néphrogénique
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
ERK	extracellular signal-regulated kinase
g	gramme
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O	eau
H <sub>3</sub> N <sup>+</sup>	ammoniac
HbA	Homogenization Buffer A
I	iode
IP <sub>3</sub>	4,5-triphosphate
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
K	potassium
L <sub>3</sub>	vertèbre lombaire 3
L	litre
MBSS	MES-Buffered Saline for Silica
ml	millilitre
mm Hg	millimètre de mercure
mmol/kg	millimole/kilogramme
mOsm	milliosmole/L ou milliosmolaire
MPF	M-phase promoting factor
Na	sodium
ng	nanogramme
NH <sub>2</sub>	amino-
nm	nanomètre

NPII	neurphysine II
NPA	asparagine-proline-alanine
N-terminal	amino-terminal
MAP kinase	Mitogen-activated protein kinases
PDI	protein disulfide isomerase
P <sub>f</sub>	perméabilité osmotique
pH	potentiel d'Hydrogène
PI3-kinase	Phosphoinositide 3-kinases
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PMC	plasma membrane complexe
protéines G	protéine à guanine
RE	réticulum endoplasmique
Rh(D)	Rhesus disease
RTG	réseau trans-Golgi
SDS	Sodium dodécylsulfate
SGLT1	sodium-glucose transporteur
T12	vertèbre thoracique 12
TBS	tris buffer saline
TBS-T	tris buffer saline-tween
TonE	tonicity responsive enhancer
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TRPV5	transient receptor potential vanilloid 5
WT	forme sauvage ou native
μl	microlitre

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma du néphron (adapté de Marieb, 2004).....	2
<b>Figure 2.</b> Schéma de l'appareil juxta-glomérulaire (adapté de Marieb, 2004).....	4
<b>Figure 3.</b> Schéma du mécanisme à contre-courant (d'après Marieb, 2004).....	10
<b>Figure 4.</b> Homologues de la vasopressine et de l'ocytocine (Donaldson, 2008).....	11
<b>Figure 5.</b> Structure 3D de l'arginine vasopressine (AVP).....	12
<b>Figure 6.</b> Synthèse et sécrétion de l'AVP (adapté de Cunningham, 2007).....	13
<b>Figure 7.</b> Structure du récepteur de l'arginine vasopressine de type 2 (AVPR2) (a) Schéma de l'AVPR2 (tiré de Bichet, 2006). (b) Structure 3D de l'AVPR2 (tiré de Mouillac, 1998).....	15
<b>Figure 8.</b> Schéma de la fonction du récepteur de l'arginine-vasopressine de type 2 (AVPR2) (adapté de Bichet, 2006).....	16
<b>Figure 9.</b> Schéma de la structure conservée des aquaporines (AQP) (d'après Nielsen, 2002).....	23
<b>Figure 10.</b> Schéma du Gating (d'après Hedfalk, 2006).....	24
<b>Figure 11.</b> Classification des aquaporines (d'après Agre, 2002).....	25
<b>Figure 12.</b> Rôle de l'AKAP lors de la fusion des endosomes contenant l'AQP2 à la membrane plasmique (selon Tasken and Aandahl, 2004).....	32
<b>Figure 13.</b> Structure secondaire de l'AQP2 (d'après Bichet, 2006).....	37
<b>Figure 14.</b> Arbre du cas familial AQP2-V24A et -R187C.....	38
<b>Figure 15.</b> Arbre du cas familial AQP2-R187C et -K228E.....	39
<b>Figure 16.</b> <i>Xenopus laevis</i> .....	40
<b>Figure 17.</b> Ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> .....	42

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> : Liste des mutations de l'AQP2 recensées.....	19
---	----

## **Remerciements**

Je tiens à remercier le Dr Daniel G Bichet pour m'avoir donné l'opportunité de faire une maîtrise dans son laboratoire. Dans ce laboratoire, le Dr Pierre Bissonnette, Yoann, Sandra et Rym m'ont apporté un soutien technique et scientifique important. Je tiens à remercier les membres du GEPROM : le Dr Jean-Yves Lapointe, le Dr Lucie Parent, le Dr Jean-Louis Schwartz, le Dr Josette Noël, le Dr Rémy Sauvé et les membres de leurs laboratoires, ainsi que pour leur précieux soutien technique, Julie Verner et Michel Brunette. De plus, pour son aide administrative, je désire remercier Joanne Payette.

De plus, je tiens à souligner l'appui que j'ai reçu de ma conjointe, Gabrielle, de mes parents, Donald et Francine, et mon frère, David dans l'élaboration du mémoire et dans mon cheminement scolaire.



## **1. Introduction**

### 1.1 Le rein

#### 1.1.1 Anatomie rénale

##### 1.1.1.1 Anatomie externe

Les reins qui ont une forme d'haricot et qui sont positionnés entre la paroi dorsale et le péritoine pariétal, s'étendent de la vertèbre T12 à la vertèbre L3. Un rein adulte moyen pèse 150g et possède les dimensions suivantes : longueur de 12 cm, largeur de 6 cm et 3 cm d'épaisseur. Trois couches de tissu enveloppent le rein. La membrane la plus interne, une capsule fibreuse transparente et étanche, protège le rein des infections provenant de l'extérieur. Une masse de tissu adipeux mitoyenne, la capsule adipeuse, protège quant à elle le rein contre les impacts extérieurs et assure le positionnement à la paroi postérieure du tronc. Une couche externe de tissu conjonctif dense, le fascia rénal, a pour rôle de relier le rein à la glande surrénale ainsi que ces derniers aux organes des structures voisines.

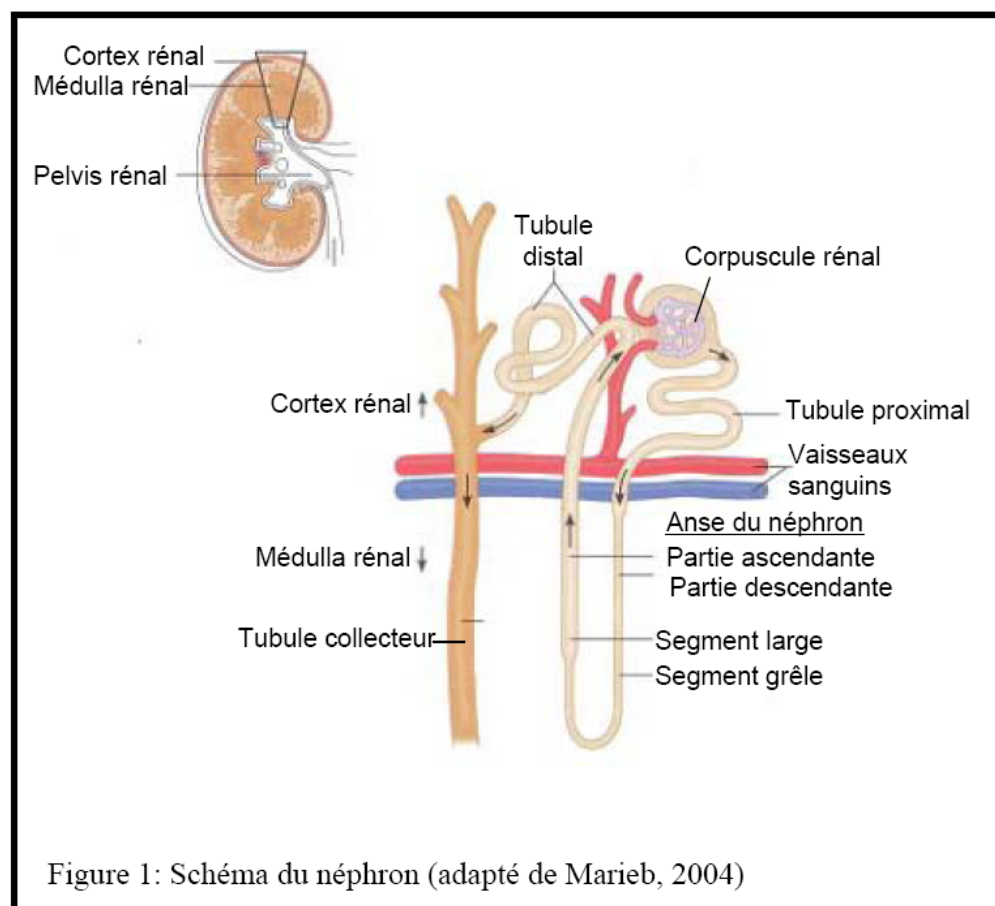
##### 1.1.1.2 Anatomie interne

En partant de l'extérieur vers l'intérieur, le rein se subdivise en trois parties distinctes ; le cortex, suivi de la médullaire puis le pelvis rénal. Le cortex est de couleur pâle et présente une texture granuleuse. Cette région du rein contient les glomérules, qui jouent un rôle primordial dans la filtration, et les tubules proximaux. La médullaire de couleur rouge brun se subdivise en pyramides rénales aussi nommées pyramides de Malpighi. La base élargie des pyramides est orientée vers le cortex, tandis que la pointe, formant la papille rénale est orientée vers le pelvis rénal. Les colonnes rénales sont les prolongements du

tissu cortical qui séparent longitudinalement les pyramides rénales. Les lobes rénaux au nombre de 8 à 18 par rein, sont constitués d'une pyramide et du tissu cortical qui les coiffent. Le pelvis rénal, ou bassinnet, est la structure qui relie le rein à l'uretère pour l'expulsion de l'urine vers la vessie.

### 1.1.2 Néphron

Le néphron (voir figure 1) est l'unité structurale et fonctionnelle du rein. On dénombre plus de 1 000 000 de néphrons par rein. Chaque néphron est constitué d'un corpuscule rénal (capsule de Bowman et bouquet capillaire artériel) et d'un tubule rénal (tubule proximal, anse de Henle et tubule distal).



#### 1.1.2.1 Corpuscule rénal

Le corpuscule rénal est formé d'une capsule de Bowman et d'un bouquet de capillaires artériels, appelé glomérule du rein. La présence de nombreux pores dans l'endothélium capillaire lui confère une perméabilité importante par ailleurs limitée par les fenestrations des podocytes qui le tapissent. Ceci permet à une grande quantité de liquide riche en soluté, mais faible en protéine plasmatique, de migrer vers le tubule proximal. On donne le nom de filtrat glomérulaire au liquide qui traverse cet espace.

#### 1.1.2.2 Tubule rénal

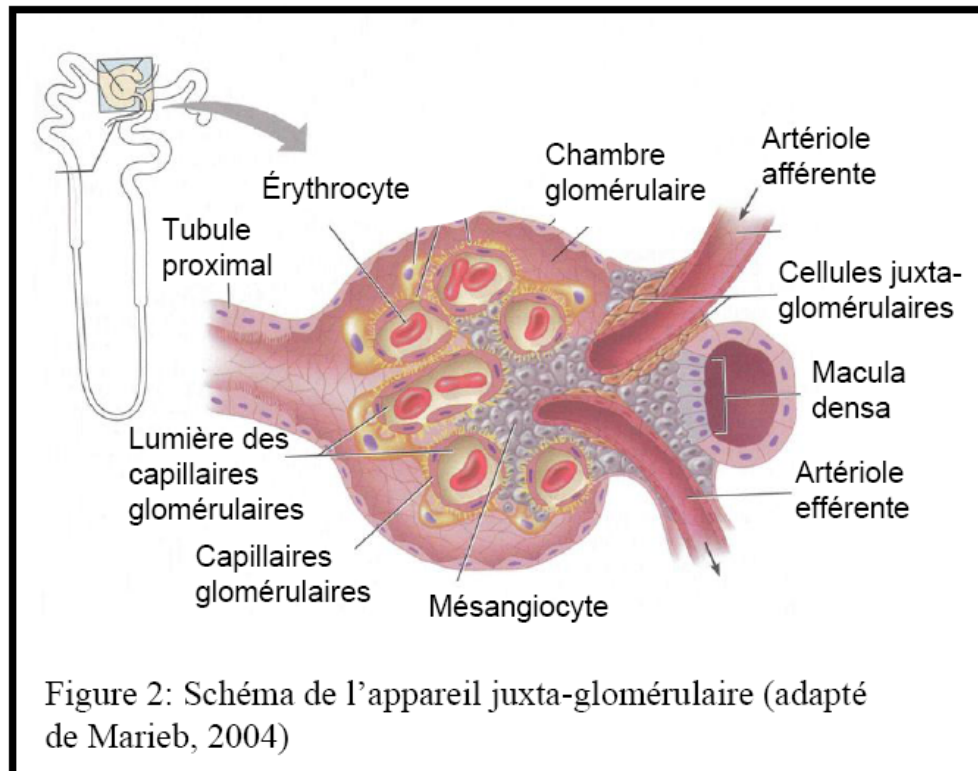
Le tubule rénal, constitué d'un épithélium simple, se divise en trois parties successives ; le tubule proximal, l'anse de Henle et le tubule distal. Après la capsule de Bowman, se trouve le tubule proximal, toujours situé dans le cortex. Les cellules de ce tissu possèdent de profondes microvillosités formant la bordure en brosse qui permet d'accroître de 20 fois la surface de contact, et donc d'échange, entre la cellule et le filtrat glomérulaire.

L'anse de Henle (anse du néphron), essentiellement située dans la médulla, est constituée d'une partie descendante puis ascendante, ce qui lui confère une forme de U. Au début de la partie descendante, la structure épithéliale semblable à celle du tubule proximal se transforme rapidement en cellules squameuses caractérisées par une forte perméabilité à l'eau. La partie ascendante, quand à elle constituée de cellules cuboïdes ou même prismatiques, est totalement imperméable à l'eau.

Le tubule distal se situe dans le cortex. Composé de cellules cuboïdales dépourvues de microvillosités, celles-ci deviennent de plus en plus hétérogènes

en approchant du tubule collecteur. On y retrouve essentiellement, les cellules intercalaires et les cellules principales.

### 1.1.2.3 Appareil juxta-glomérulaire



L'appareil juxta-glomérulaire (voir figure 2) est une sous-structure spécialisée du néphron située à la base du glomérule, constitué de la partie initiale du tubule distal et de l'artériole afférente. Par sa capacité de régulation du débit sanguin au glomérule via le système rénine-angiotensine, ce système remplit une fonction capitale dans le contrôle de la pression artérielle systémique et du débit du filtrat glomérulaire. À cet endroit précis, des cellules musculaires lisses différenciées contenant de la rénine, appelées cellules juxta-glomérulaires, ont pour rôle de détecter la pression artérielle. Face à celles-ci,

les cellules de la Macula Densa issues du tubule distal perçoivent le contenu en chlorure de sodium du tubule distal.

### 1.1.3 Vascularisation rénale

En raison de leurs rôles de purification et de régulation hydrique, les reins possèdent un vaste réseau sanguin. Au repos, le rein reçoit via les artères rénales 1.2 L de sang par minute, soit 20 à 25 % du débit cardiaque total. Chaque artère rénale se divise en cinq artères segmentaires du rein, puis en artères interlobaires dans la médulla. De retour au cortex, les artères lobaires donnent naissance aux artères arquées du rein qui recouvrent les pyramides rénales. Notons que plus de 90% du sang entrant au rein irrigue le cortex contre seulement 10% irriguant la médulla. Le circuit veineux suit approximativement le même trajet que celui des artères.

## 1.2. Physiologie Rénale

Des 1200 ml de sang qui traversent les glomérules chaque minute, on compte 650 ml de plasma, dont 125 ml passe au travers du filtre glomérulaire. Le rein utilise de 20 à 25% de tout l'oxygène consommé par l'organisme au repos pour le transport actif d'ion sodium par la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ . Le filtrat glomérulaire possède les mêmes éléments que le plasma sanguin à l'exception des protéines. Une fois rendu au tubule collecteur, le filtrat glomérulaire aura perdu la majorité de son eau, des nutriments et des ions qui le constituait à l'origine. L'urine finale est composée du reste et des déchets métaboliques. Des 180 L de liquide filtré par le rein quotidiennement, seulement 1% sera excrété. Trois étapes constitutives sont à la base de la formation de l'urine, soit la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire, puis l'excrétion tubulaire.

### 1.2.1 Filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire est un processus passif et non sélectif, pour les protéines <10 kDa, où les solutés et les liquides sont forcés au travers une membrane sous l'action de la pression hydrostatique. Le liquide ainsi formé, soit le filtrat glomérulaire, se retrouve dans la chambre glomérulaire. Le glomérule est un filtre très efficace vu la grande superficie de sa membrane de filtration et son haut taux de perméabilité aux solutés et aux solvants. De plus, la pression sanguine élevée dans le capillaire glomérulaire (55 mm Hg plutôt que 18 mm Hg par rapport aux autres capillaires de l'organisme) favorise le flux net de liquide vers la chambre glomérulaire.

La membrane de filtration est composée de trois couches. La première est composée de cellules endothéliales qui pourvu de pores d'environ de 70 nm tapissé de glycoprotéine chargé négativement (O'Callaghan and O'Callaghan 2006), les petites molécules tels que l'eau, le glucose, les acides aminés et les déchets azotés, ont la possibilité de traverser librement. La deuxième est le feuillet viscéral formé de podocytes et la troisième est la membrane basal du glomérule. Incidemment, les molécules qui ont une taille de 7 nm et plus, telles les grosses protéines, ne peuvent traverser la membrane de filtration.

### 1.2.2 Réabsorption tubulaire

La réabsorption tubulaire est un mécanisme de transport transépithélial qui débute dès l'entrée dans le tubule proximal. Cette réabsorption comprend le transport à travers les membranes apicale, basolatérale et la voie paracellulaire de même que le transport du milieu interstitiel aux capillaires péri-tubulaires. La fonction première de la réabsorption tubulaire est de restituer au sang ses différents constituants tels les nutriments, les minéraux et l'eau. Le rein réabsorbe ainsi presque toutes les molécules biochimiques tels le glucose et les

acides aminés. Les signaux hormonaux dictent la réabsorption de l'eau et des ions par transport actif et/ou passif.

Quantitativement, l'ion sodium est le cation le plus important du filtrat. Celui-ci est réabsorbé via des systèmes de cotransport actif de type secondaire dont le but essentiel est d'assurer la réabsorption de nutriments. L'ion sodium, conjointement avec les diverses molécules réabsorbées, franchit la membrane apicale des cellules tubulaires par transport actif secondaire puis traverse la membrane basolatérale via le transport actif de la pompe à sodium, la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase, avant de diffuser dans les capillaires. La réabsorption du sodium cause un gradient osmotique qui engendre une réabsorption d'eau par transport passif grâce aux pores appelés aquaporines (AQP) dans certain segment tubulaire. Ce mouvement d'eau engendre une augmentation de la concentration des solutés non-réabsorbés du filtrat. À la sortie du tubule proximal, la grande majorité des métabolites organiques sont réabsorbés. Composé d'eau et de sels, le volume du filtrat est ainsi réduit de 70% de son volume initial.

Certaines substances ne seront pas réabsorbées ; des molécules qui ne sont pas liposolubles ou qui n'ont pas de transporteurs et/ou sont trop grosses pour passer par les pores de la membrane plasmique seront ainsi séquestrés dans le filtrat. Les molécules d'urée, bien qu'étant réabsorbé par les systèmes de transport spécifiques, sont éliminées de 40 à 50 %. La créatinine et l'acide urique sont deux composés fortement excrétés par les reins.

### 1.2.3 Sécrétion tubulaire

La sécrétion tubulaire a pour fonction d'éliminer des substances non-présentes dans le filtrat (comme certains médicaments), les substances nuisibles ou produits finaux du métabolisme réabsorbés passivement (comme l'urée, l'acide

urique), les ions  $K^+$  en excès et de régler le pH sanguin. Ces substances sont activement sécrétées dans la lumière tubulaire à partir liquide interstitiel.

#### 1.2.4 Régulation de la concentration et du volume de l'urine

Une des fonctions les plus importantes du rein est de maintenir l'osmolarité dans l'organisme à 300 mmol/kg en ajustant la concentration et le volume de l'urine. Pour ce faire, un mécanisme complexe à contre-courant est utilisé.

##### 1.2.4.1 Multiplicateur à contre-courant

Le principal rôle de l'anse de Henlé est celui de multiplicateur à contre courant du gradient osmotique. Les différentes sections de l'anse de Henlé possèdent différentes tâches, afin que le multiplicateur à contre-courant puisse fonctionner correctement (voir figure 3).

La partie descendante de l'anse de Henlé permet la réabsorption de près de 20% de l'eau contenue dans le filtrat. Ce qui augmente l'osmolalité du liquide interstitiel le long de cette partie de l'anse. L'absence de transporteur dans cette section empêchera tout transport d'ion. Par conséquent, on observe dans le coude de l'anse du néphron l'osmolalité la plus haute, soit 1 200 mmol/kg. Le transport de l'eau est de type transcellulaire

À la partie ascendante de l'anse de Henlé, le tubule est imperméable à l'eau et sélectivement perméable aux ions. À ce moment la concentration en ions chlore et sodium du filtrat est très élevée. Le segment grêle ainsi que le segment large de la partie ascendante du néphron vont réabsorber ces ions grâce au cotransporteur  $Na^+-K^+-2Cl^-$ . À mesure qu'il y a réabsorption de ces ions, l'osmolalité de la médulla augmente. Au tubule contourné distal, l'osmolalité



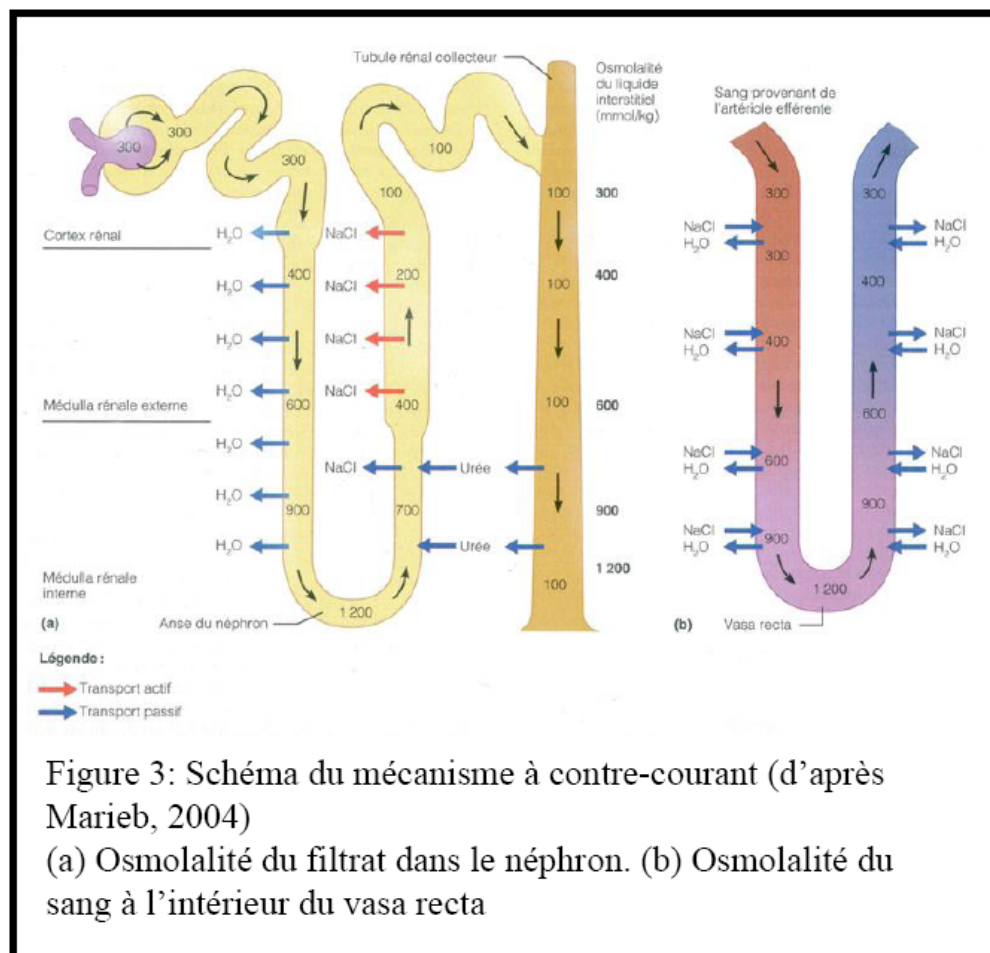
du filtrat est à 100 mmol/kg. À ce moment, le filtrat est hypotonique par rapport au plasma sanguin.

Une fois que les ions sodium et chlorure sont réabsorbés par la partie ascendante de l'anse, certains de ces ions vont diffuser vers la partie descendante de l'anse. Ceci engendre une différence de concentration des solutés, le filtrat de la partie ascendante est inférieur de 200 mmol/kg au filtrat contenu dans la partie descendante et au liquide interstitiel environnant. L'anse du Henlé multiplie ces petites variations de solutés, afin d'obtenir, du cortex à la médulla, un gradient de concentration de 900 mmol/kg approximativement. La partie ascendante et descendante sont assez près l'une de l'autre pour influencer leurs échanges respectifs avec le milieu interstitiel. Ceci fait en sorte que la réabsorption de l'eau au niveau de la partie descendante crée un filtrat plus concentré en ions que le milieu interstitiel, ce qui force la réabsorption d'ions au niveau de la partie ascendante, afin d'augmenter la concentration ionique du milieu interstitiel. Cette augmentation de la concentration ionique du milieu interstitiel crée le gradient nécessaire afin de pouvoir réabsorber au niveau de la partie descendante.

Le tubule collecteur réabsorbe l'urée, afin de maintenir une forte osmolalité de la partie profonde de la médulla. Seule cette section du néphron est perméable à l'urée, même si à fortes concentrations, l'urée peut pénétrer par les cellules de la partie ascendante de l'anse. L'urée est absorbée et s'échappe passivement jusqu'à ce que sa concentration à l'intérieur et à l'extérieur du tubule soit semblable. Ceci n'a pour effet que d'équilibrer la concentration d'urée de part et d'autre du tubule, contrairement à ce qui est observé avec la réabsorption d'ions sodium et d'ions chlorure.

#### 1.2.4.2 Échangeur à contre-courant

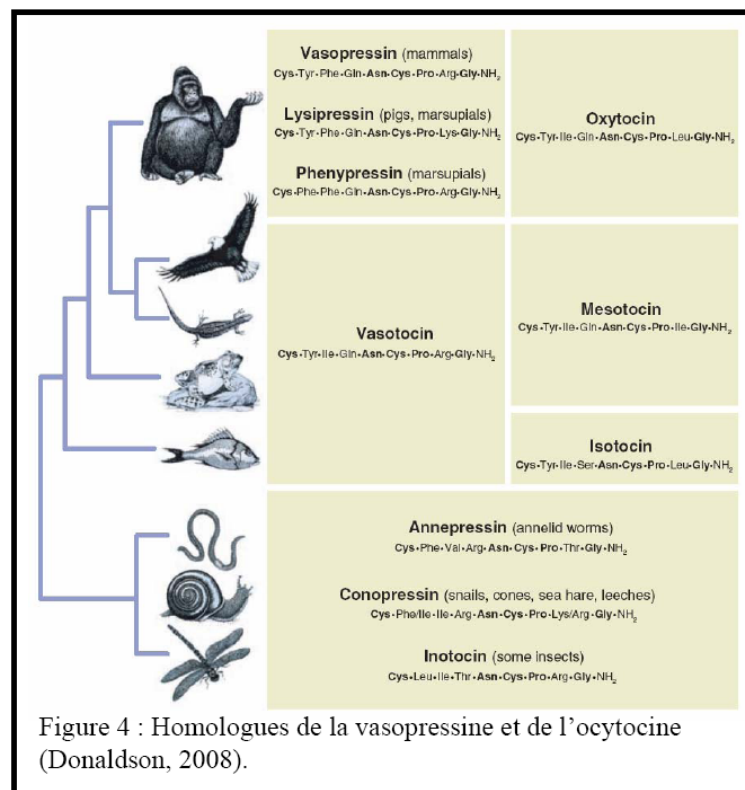
Le rôle de la vasa recta est de maintenir le gradient osmotique établi par l'anse de Henlé. Ces vaisseaux sont perméables aux ions et à l'eau ce qui leur permet de faire des échanges passifs avec le milieu interstitiel. Dans les parties profondes de la médulla, ces vaisseaux deviennent hypertoniques contrairement au cortex, où ils deviennent hypotoniques. Ce mécanisme aura pour effet d'empêcher l'élimination rapide des ions de l'espace interstitiel de la médulla, étant donné que la plupart des ions sortant d'une anse sont repris dans l'autre anse.



### 1.3 Réabsorption de l'eau par l'hormone antidiurétique

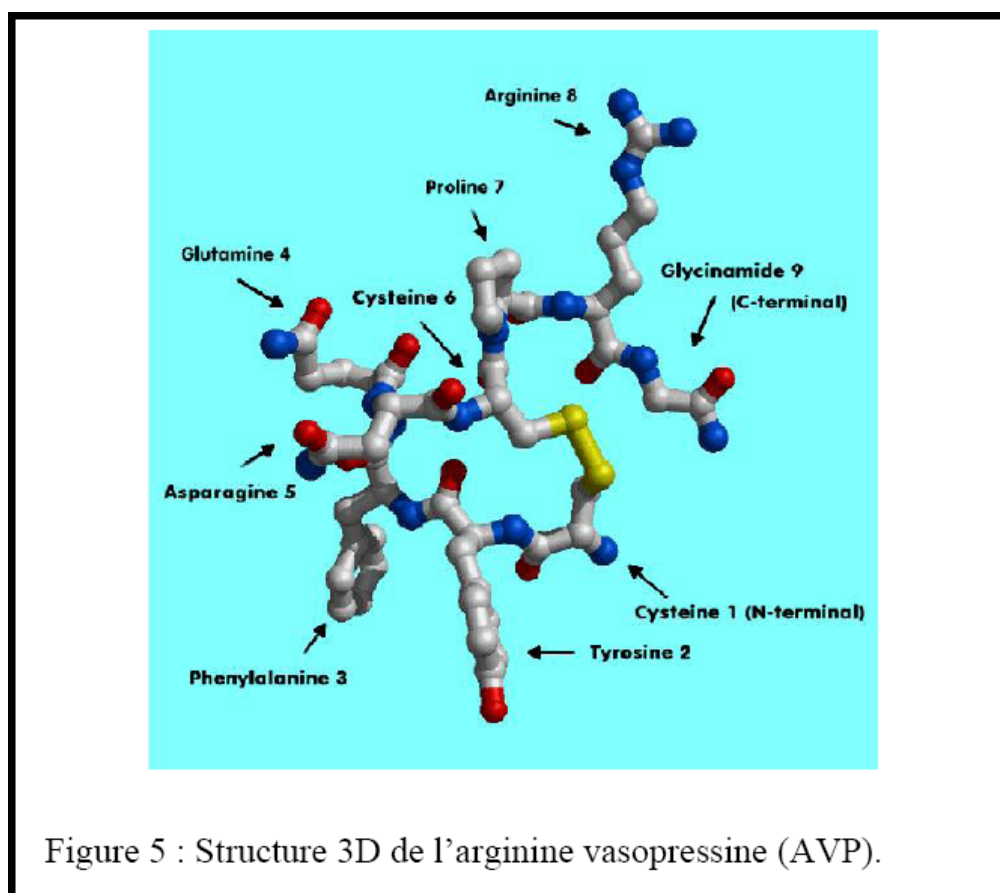
#### 1.3.1 Hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique est un polypeptide synthétisé dans l'hypothalamus, emmagasiné dans la post-hypophyse et libéré au besoin dans la circulation sanguine. Elle est aussi appelée arginine vasopressine (AVP) ou encore simplement vasopressine. Elle possède un rôle antidiurétique et presseur. Les homologues de la vasopressine et l'ocytocine existent depuis 700 millions d'années et ont été identifiés chez des hydres, des vers, des insectes et des vertébrés. La différence entre la vasopressine et l'ocytocine est de seulement deux acides aminés. Il a été proposé que l'ocytocine et la vasopressine sont apparues d'un événement de duplication génique avant la divergence des vertébrés, étant donné que les gènes sont retrouvés bout à bout sur le même chromosome (Donaldson and Young 2008) (voir figure 4).



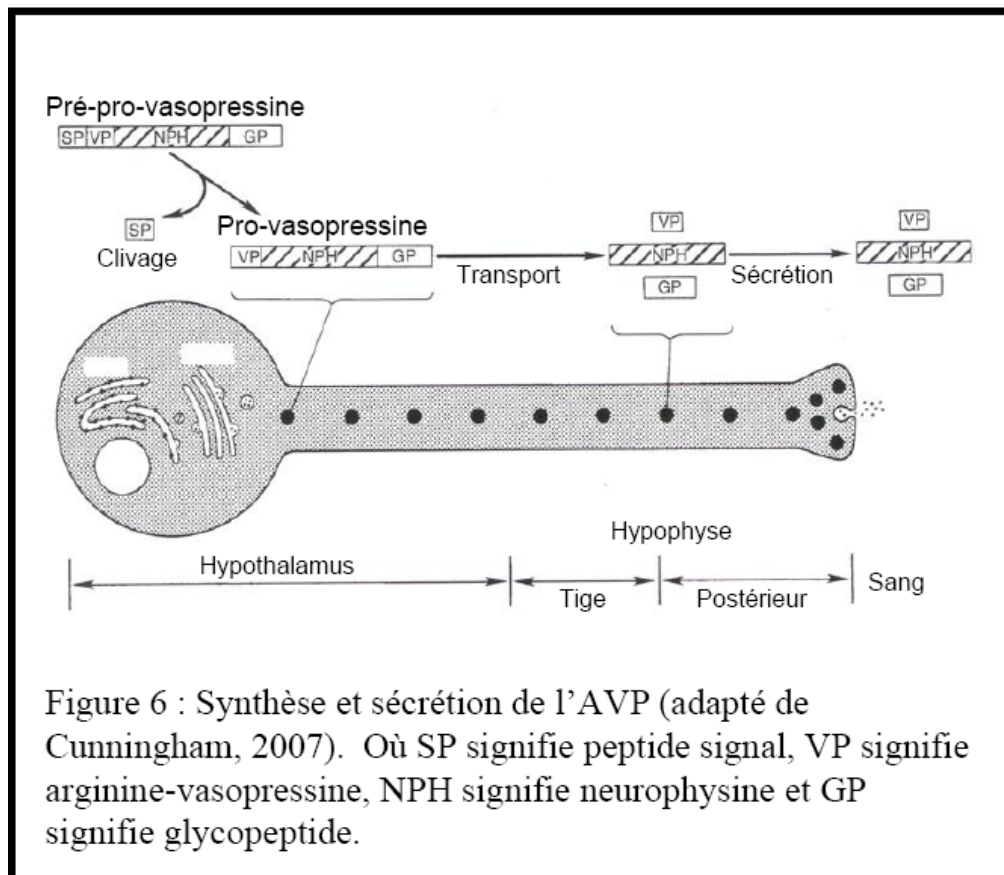
### 1.3.1.1 Synthèse

La vasopressine (Figure 5) est un polypeptide cyclique formé de neuf acides aminés,  $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Cys}-\text{Tyr}-\text{Phe}-\text{Glu}-\text{Asp}-\text{Cys}-\text{Pro}-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{NH}_2$ , où les deux cystéines sont liés par un pont disulfure. Cette structure est homologue à l'oxytocine, à l'exception d'une isoleucine et d'une leucine qui remplacent respectivement une phénylalanine et une arginine (Voet 1995).



La sécrétion de la vasopressine est régie principalement par l'osmolarité du liquide extracellulaire et la pression sanguine. Ainsi, lorsque le sang qui irrigue le complexe hypothalamo-hypophysaire devient hypertonique ou encore lorsque la pression sanguine y est trop faible, la sécrétion de vasopressine est

initée. La maturation de la vasopressine débute dans l'hypothalamus où un clivage de la pré-pro-vasopressine en pro-vasopressine et de la pro-vasopressine en vasopressine se produit. La vasopressine est transportée dans l'hypophyse où elle est entreposée jusqu'au moment de la sécrétion (voir figure 6).



#### 1.3.1.2 Fonction

Au-delà du contrôle de l'osmolarité des liquides extracellulaires et du volume sanguin, la vasopressine est aussi impliquée dans la régulation de la concentration intracellulaire, la contraction des muscles vasculaires lisses, l'agrégation plaquettaire, la glycogénolyse hépatique, la mitogenèse, la sécrétion d'aldostérone, la libération de facteurs de coagulation endothéliaux, la

modulation de la sécrétion d'hormone corticotrope (ACTH), et la thermorégulation. De plus, chez certaines espèces, la vasopressine cause des modifications du comportement incluant l'agressivité, les comportements sexuels, affectifs et parentaux (Thibonnier, Coles et al. 2001; Donaldson and Young 2008).

### 1.3.2 Récepteurs de l'hormone antidiurétique

À ce jour, trois récepteurs de l'AVP ont été identifiés : V1a (AVPR1a), V1b/V3 (AVPR1b/AVPR3) et V2 (AVPR2). Les trois types de récepteurs sont couplés aux protéines G. Les récepteurs AVPR1a ont été identifiés dans le foie, le rein, la rate, les gonades, les cellules musculaires vasculaires lisses et les thrombocytes. Les récepteurs AVPR1b/AVPR3 ont été identifiés dans l'hypophyse. Les récepteurs AVPR2 sont quant à eux retrouvés, principalement, sur la membrane basolatérale des cellules principales des tubules collecteurs du rein.

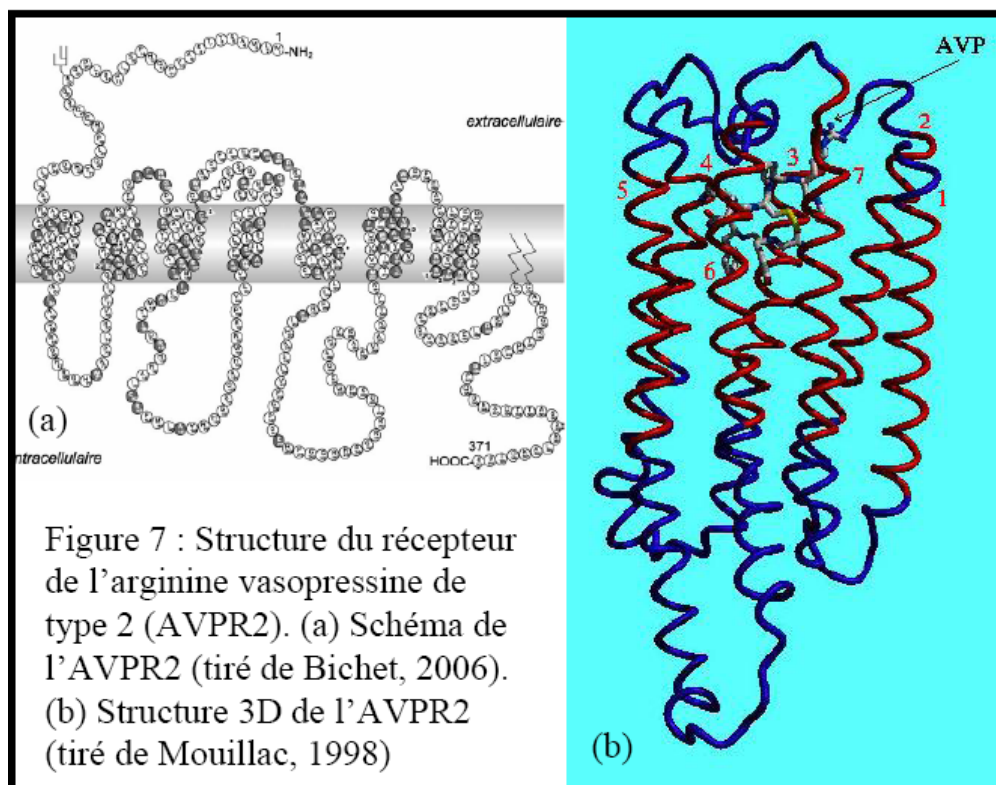
#### 1.3.2.1 AVPR2

La liaison de l'AVP au récepteur AVPR2 entraîne une cascade intracellulaire qui passe par l'augmentation des niveaux d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), l'activation des PKA (protéine kinase A) et la liaison de ces dernières à AKAP (PKA anchoring proteins) ce qui conduit à l'exocytose de l'AQP2 à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. Ceci confère un rôle d'antidiurétique au récepteur AVPR2.

##### 1.3.2.2.1 Structure

L'AVPR2 fut cloné en 1992. Ce gène de 2kb situé sur le chromosome Xq28 possède trois exons et deux introns. Le récepteur constitué de 371 acides

aminés présente sept domaines transmembranaires, quatre domaines extracellulaires et quatre domaines intracellulaires, lui conférant une structure semblable à celle des récepteurs membranaires liés aux protéines G (figure 7). Il possède un site de glycosylation situé dans la région N-terminale, deux cystéines situées dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires formant un pont disulfure. De plus, on observe deux sites de palmitoylation dans l'extrémité C-terminale. La protéine se présente à la membrane sous forme de dimère (Hebert, Moffett et al. 1996).



#### 1.3.2.2.2 Fonction

La liaison de l'AVP à l'AVPR2, cause un changement de conformation de la protéine G stimulatrice qui induit l'activation de l'adénylate cyclase. L'AVPR2 interagit avec quatre isoformes de l'adénylate cyclase (AC), soit AC4, AC5,

AC6 et AC9. L'AC catalyse l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Deux types de régulation découlent de l'activité de l'AMPc, soit une régulation à court terme qui cause la fusion des vésicules contenant l'AQP2 avec la membrane apicale et une régulation à long terme qui induit la transcription de l'AQP2 via l'action de la « cAMP response element binding protein » (CREB) et c-Jun/c-Fos (Nielsen, Kwon et al. 1999). Ces deux protéines vont, ensuite, se lier au gène de l'AQP2 (Marples, Frokiaer et al. 1999) (figure 8).

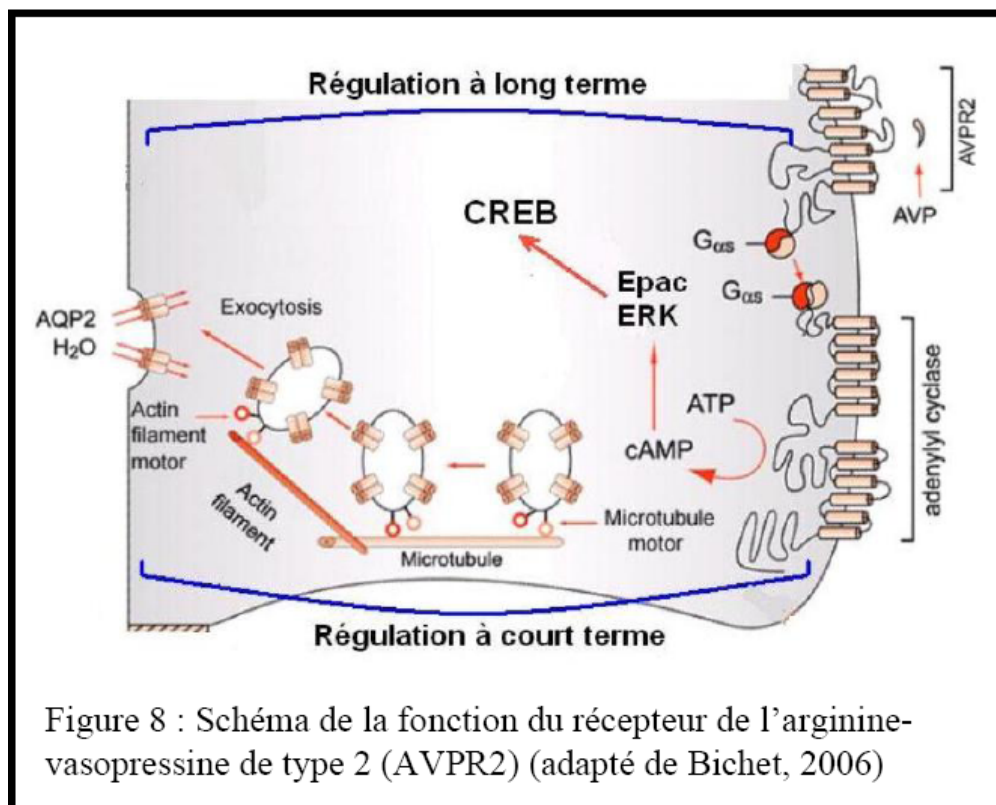


Figure 8 : Schéma de la fonction du récepteur de l'arginine-vasopressine de type 2 (AVPR2) (adapté de Bichet, 2006)

#### 1.3.2.2.3 Endocytose et désensibilisation

L'AVPR2 est un membre de la famille de protéines membranaires des « G protein-coupled receptor » (GPCR). Le retrait du récepteur de la surface cellulaire vers un compartiment intracellulaire est induit par la présence d'un



agoniste. L'AVPR2 est internalisé par des puits tapissés de clathrines via un procédé où l'arrestine et la dynamine sont nécessaires (Bowen-Pidgeon, Innamorati et al. 2001). Le retrait de l'agoniste ne permet pas le recyclage, tant et aussi longtemps que le récepteur est phosphorylé (Innamorati, Sadeghi et al. 1999). L'élimination du site de phosphorylation de l'extrémité C-terminale du récepteur permet un recyclage rapide des formes mutées comparativement aux formes natives lorsque le récepteur est situé au niveau des compartiments périnucléaires (Innamorati, Le Gouill et al. 2001). La dégradation de l'AVPR2 est causée par ubiquitination avec l'arrestine comme l'intermédiaire. Cependant, le mécanisme exact reste peu connu (Madziva and Birnbaumer 2006).

#### 1.4 Diabète insipide

Les diabètes insipides (DI) sont définis par une polyurie et une incapacité de concentrer l'urine. Chez le patient la diurèse est anormalement élevée ( $>30\text{mL/kg/jour}$  pour un patient adulte) et l'urine possède une faible osmolarité ( $<250\text{mmol/kg}$ ) (Bichet 2006), une osmolarité normale étant de 250 à 850 mmol/kg. Il existe deux types de DI, soit le diabète insipide central (DIC) et diabète insipide néphrogénique (DIN).

Le DIC est causé par une production insuffisante de l'arginine-vasopressine (AVP). Cet état peut être héréditaire, conséquences de mutations autosomiques du gène de la vasopressine, ou acquis tel qu'induit par des traumatismes crâniens, des tumeurs cérébrales ou encore des maladies auto-immunes. Le DIC peut être traité par l'administration de dDAVP, un analogue synthétique de l'AVP.

Le DIN est défini par un état de résistance de l'individu à l'hormone antidiurétique, avec ou sans possibilité de générer un gradient osmolaire

corticomédullaire. Le DIN acquis peut-être causé par un traitement au lithium (Marples, Christensen et al. 1995), une hypokaliémie (Frokiaer, Marples et al. 1996) ou encore une obstruction de l'uretère (Marples, Frokiaer et al. 1996). Le DIN héréditaire est dans 90% des cas à transmission liée au chromosome X et dans 10% à une hérédité autosomique récessive ou dominante secondaire.

#### 1.4.1 DIN héréditaires liés au chromosome X

Les individus atteints du DIN héréditaires liés au chromosome X possèdent des mutations dans le gène du récepteur de l'arginine-vasopressine (AVPR2). Cette maladie rare a une incidence de 8.8 pour 1 million d'enfant mâles à la naissance (Arthus, Lonergan et al. 2000). Les caractéristiques cliniques de cette maladie sont l'hypernatrémie, l'hyperthermie, le retard mental et la déshydratation définie par des épisodes de polyurie et de polydipsie. Dans la majorité des cas de DIN héréditaire lié au chromosome X, l'individu est atteint de mutations ancestrales. Cependant, des mutations spontanées peuvent aussi se produire (Arthus, Lonergan et al. 2000).

En 2006, 183 mutations issues de 239 familles d'origines ancestrales différentes étaient identifiées. Parmi celle-ci, 50% étaient de type faux-sens, 27% étaient causées par une délétion ou insertion de nucléotides qui causait un décalage dans le cadre de lecture, 11% étaient de type non-sens, 5% étaient dus à de grandes délétions. Aussi, 4% des cas, étaient causées par des délétions ou insertions en phase, et 2% par un épissage erroné (Bichet 2006). L'expression *in vitro* d'une majorité de ces mutations démontre que les récepteurs mutés restent séquestrés au réticulum endoplasmique résultant d'une perte de signalisation (Morello and Bichet 2001). Ce défaut d'adressage à la membrane est généralement observé chez les maladies héréditaires causées par des mutations de gènes codant pour des protéines membranaires (Kuznetsov and Nigam 1998).

### 1.4.2 DIN autosomiques

Les individus atteints du DIN autosomiques récessifs ou dominants secondaires présentent des mutations du gène codant pour l'aquaporine (AQP2). Le gène se situe sur le locus 12q13 du chromosome 12 chez l'humain. En 1994, des études portant sur des hommes et des femmes atteints du DIN non lié au chromosome X ont permis de caractériser cette nouvelle forme de DIN (Deen, Croes et al. 1995).

Les mutations fautives du DIN autosomique récessif sont distribuées tout au long du gène, comparativement aux mutations responsables du DIN autosomique dominant qui se situent essentiellement dans la queue carboxy-terminale de la protéine (Mulders, Bichet et al. 1998). De plus, les mutations causant le DIN autosomique récessif doivent se retrouver sur les deux allèles pour exprimer la pathologie, tandis que les mutations responsables du DIN autosomique dominant ne requièrent qu'un seul allèle.

À ce jour, 41 mutations ont été identifiées chez 40 familles (Tableau I). Les mutations du canal AQP2 (voir section suivante) peuvent être issues de mutations faux-sens (65%), de délétions ou insertions de nucléotides causant un décalage dans le cadre de lecture (23%), de mutations non-sens (8%) ou de mutations d'épissage (4%). Des études d'expression in vitro des mutants de l'AQP2 ont démontré que les mutants restent séquestrés à l'intérieur de la cellule et sont dégradés, de par leur incapacité à adopter une conformation compatible avec leur état mature (Tamarappoo and Verkman 1998).

	# de Familles	Nom de la mutation	Domaine	Changement de nucléotide	Conséquence prédite	Référence
		<b>Faux-sens (31)</b>				
1	1	L22V	TMI	CTC-à-GTC	Leu-à-Val	(Canfield, Tamarappoo et al. 1997)
2	1	L28P	TMI	CTC-à-CCC	Leu-à-Pro	(Marr, Bichet et al. 2002)

3	2	A47V	TMII	GCG-à-GTG	Ala-à-Val	(Marr, Bichet et al. 2002)
4	2	Q57P	TMII	CAG-à-CCG	Glu-à-Pro	(Lin, Bichet et al. 2002)
5	1	G64R	CII	GGG-à-AGG	Gly-à-Arg	(van Lieburg, Verdijk et al. 1994)
6	1	N68S	CII	AAC-à-AGC	Asn-à-Ser	(Mulders, Knoers et al. 1997)
7	1	A70D	CII	GCC-à-GAC	Ala-à-Asp	(Cheong, Cho et al. 2005)
8	2	V71M	CII	GTG-à-ATG	Val-à-Met	(Marr, Bichet et al. 2002)
9	2	G100V	TMIII	GGA-à-GTA	Gly-à-Val	(Lin, Bichet et al. 2002)
10	1	G100R	TMIII	GGA-à-AGA	Gly-à-Arg	(Carroll, Al-Mojalli et al. 2006)
11	1	I107D	EII	ATC-à-AAC	Ile-à-Asp	(Zaki, Schoneberg et al. 2006)
12	1	T125M	EII	ACG-à-ATG	Thr-à-Met	(Goji, Kuwahara et al. 1998)
13	1	T126M	EII	ACG-à-ATG	Thr-à-Met	(Mulders, Knoers et al. 1997)
14	1	A147T	TMIV	GCC-à-ACC	Ala-à-Thr	(Mulders, Knoers et al. 1997)
15	2	D150E	ICII	GAT-à-GAA	Asp-à-Glu	
16	1	V168M	TMV	GTG-à-ATG	Val-à-Met	(Vargas-Poussou, Forestier et al. 1997)
17	1	G175R	TMV	GGG-à-AGG	Gly-à-Arg	(Goji, Kuwahara et al. 1998)
18	1	G180S	EIII	GGC-à-AGC	Gly-à-Ser	(Carroll, Al-Mojalli et al. 2006)
19	1	C181W	EIII	TGC-à-TGG	Cys-à-Trp	(Canfield, Tamarappoo et al. 1997)
20	1	P185A	EIII	CCT-à-GCT	Pro-à-Ala	(Marr, Bichet et al. 2002)
21	3	R187C	EIII	CGC-à-TGC	Arg-à-Cys	(Deen, Weghuis et al. 1994)
22	1	R187H	EIII	CGC-à-CAC	Arg-à-His	(Cheong, Cho et al. 2005)
23	1	A190T	EIII	GCT-à-ACT	Ala-à-Thr	(Kuwahara 1998)
24	1	G196D	EIII	GGC-à-GAC	Gly-à-Asp	
25	1	W202C	EIII	TGG-à-TGT	Trp-à-Cys	(Oksche, Moller et al. 1996)
26	1	G215C	TMVI	GGC-à-TGC	Gly-à-Cys	(Iolascon, Aglio et al. 2007)
27	2	S216P	TMVI	TCC-à-CCC	Ser-à-Pro	(Deen, Weghuis et al. 1994)
28	1	R254Q	CIV	CGG-à-CAG	Arg-à-Gln	
29	1	R254L	CIV	CGG-à-CTG	Arg-à-Leu	(de Mattia, Savelkoul et al. 2005)
30	1	E258K	CIV	GAG-à-AAG	Glu-à-Lys	(Mulders, Bichet et al. 1998)
31	2	P262L	CIV	CCG-à-CTG	Pro-à-Leu	(Kuwahara 1998)
		<b>Non-sens (2)</b>				
1	2	R85X	CII	CGA-à-TGA	Arg-à-stop	(Vargas-Poussou, Forestier et al. 1997)
2	1	G100X	TMIII	GGA-à-TGA	Gly-à-stop	(Hochberg, Van Lieburg et al. 1997)
		<b>Décalage du cadre de lecture (6)</b>				
1	1	369delC	EII	1bp délétion	Arrêt au codon 131	(van Lieburg, Verdijk et al. 1994)

2	1	721delG	CIV	1 bp délétion	post-élongation	(Kuwahara, Iwai et al. 2001)
3	1	727delG	CIV	1 bp délétion	post-élongation	(Marr, Bichet et al. 2002)
4	1	763-772del	CIV	10 bp délétion	post-élongation	(Kuwahara, Iwai et al. 2001)
5	1	779-780insA	CIV	1 bp insertion	post-élongation	(Kamsteeg, Bichet et al. 2003)
6	1	812-818del	CIV	7 bp délétion	post-élongation	(Kuwahara, Iwai et al. 2001)
Épissage (2)						
1	1	IVS2-1G>A	NA	G-à-A	NA	(Bichet, non-publié)
2	1	IVS3+1G>A	NA	G-à-A	NA	(Marr, Bichet et al. 2002)

Tableau I : Liste des mutations de l'AQP2 recensées.

### 1.5 Les aquaporines

En 1987, un groupe de recherche dirigé par le Dr Peter Agre qui recevra pour cette découverte le prix Nobel de chimie en 2003, a identifié la protéine membranaire de 28 kDa, CHIP28 (Channel Integral Protein), lors d'études portant sur l'antigène Rh(D) dans les membranes d'érythrocytes (Agre, Saboori et al. 1987). À partir d'une séquence peptidique, le groupe a découvert une séquence génomique qu'il a utilisée pour cribler une librairie génomique et a identifié un gène codant pour une protéine membranaire. En 1991, des études utilisant les ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant l'ARNm de cette protéine, ont permis de démontrer que cette protéine devait être le pore à eau des globules rouges (Preston, Carroll et al. 1992). Suite à cette découverte, plusieurs protéines homologues ont démontré une fonction similaire et le terme aquaporine a donc été désigné pour nommer cette nouvelle famille de protéines (Agre, Sasaki et al. 1993). CHIP28 a été fut ainsi rebaptisé aquaporine-1 (AQP1). À ce jour, 12 aquaporines ont été identifiées chez les mammifères et des centaines de protéines homologues répertoriées dans diverses espèces (Schrier and Cadnapaphornchai 2003) dont 35 aquaporines chez les plantes.

### 1.5.1 Structure générale

Des études de structure tertiaire de l'AQP1 humain (Murata, Mitsuoka et al. 2000) et d'aquaglycéroporines GlpF d'E.Coli (Fu, Libson et al. 2000) ont démontré que les aquaporines présentent une forme de « sablier » (Jung, Preston et al. 1994). Le noyau conservé consiste de six domaines transmembranaires composés d'hélices  $\alpha$  qui créent un pore au travers de la membrane. Un septième domaine transmembranaire est créé par les boucles B et E, qui forme une demi-hélice et qui se replie dans le canal à partir du côté opposé de la membrane. La queue N-terminale de ces demi-hélices possède le motif Asn-Pro-Ala (NPA) qui se retrouve au centre de la bicouche lipidique. Une autre structure conservée chez la famille aquaporine est la région de constriction ar/R (aromatique/arginine), constituée d'une arginine et de trois acides aminés dont un possède une chaîne aromatique. In vivo, l'aquaporine est un homotétramère (Fu, Libson et al. 2000; Murata, Mitsuoka et al. 2000; Tajkhorshid, Nollert et al. 2002; de Mattia, Savelkoul et al. 2005) où seulement un des monomères est phosphorylé sur la sérine à la position 256. Cette phosphorylation observée chez les aquaporines de 1 à 5 (Yang and Verkman 1997) n'est pas requise pour l'adressage normal à la membrane plasmique (de Mattia, Savelkoul et al. 2005). Notons aussi que la majorité des aquaporines (AQP) sont inhibées lorsqu'elles sont exposées au mercure. Étant donné le grand nombre de publications sur les aquaporines, la structure et la fonction sont détaillées à un niveau inégalé par rapport à d'autres protéines membranaires.

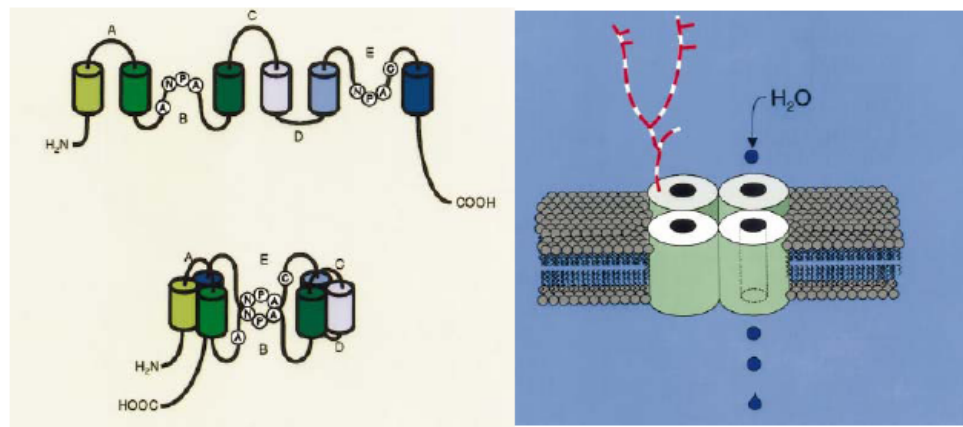
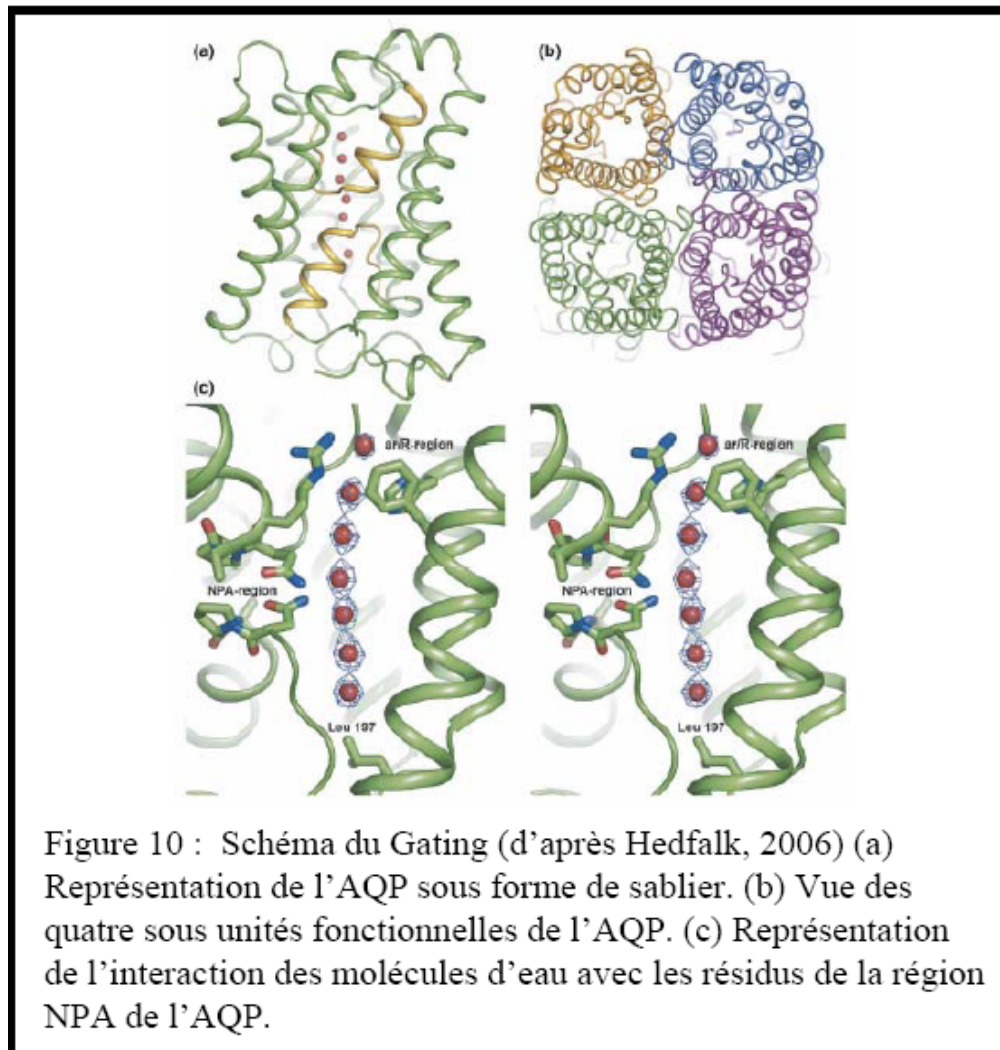


Figure 9 : Schéma de la structure conservée des aquaporines (AQP) (d'après Nielsen, 2002). (a) Structure tertiaire conservée des AQPs. Présence des motifs NPA sur les boucles B et E. (b) AQP sous forme de tétramère avec la glycosylation sur une des sous unités.

### 1.5.2 Spécificité du transport de l'eau

Des simulations ont démontré que les molécules d'eau se positionnent de manière à adopter une configuration de file indienne au travers du canal transmembranaire. De plus, une réorientation de la molécule d'eau est observée dans la région du motif NPA (de Groot and Grubmuller 2001; Tajkhorshid, Nollert et al. 2002). Cette réorientation est causée par les interactions du potentiel électrostatique de la région NPA formé par les macrodipoles des demi-hélices des boucles B et E. Plus précisément, l'atome d'oxygène de l'eau crée des liens hydrogènes avec les atomes NH<sub>3</sub> des asparagines ce qui fixera le dipôle de l'eau perpendiculairement à l'axe du canal. À l'opposé des motifs NPA sur le canal se trouve des résidus hydrophobes uniquement, afin d'empêcher tous liens hydrogènes ce qui permet la liaison d'une seule molécule d'eau aux asparagines.



Il semblerait que cette barrière électrostatique soit la principale cause de l'exclusion des protons, des molécules chargées et celles plus grosses que l'eau (Kozono, Yasui et al. 2002; de Groot, Frigato et al. 2003; Chakrabarti, Tajkhorshid et al. 2004).

### 1.5.3 Classification

Les aquaporines peuvent être divisées en 3 catégories selon leurs propriétés de transport. On retrouve premièrement les aquaporines classiques (AQP-0, -1, -2,



-4 et -5) qui transportent uniquement de l'eau et qui jouent un rôle essentiel dans la régulation cellulaire de l'eau, puis les aquaglycéroporines (AQP-3, -7, -9 et -10) qui sont perméables à de petites molécules non-chargées en plus de l'eau et finalement les aquaporines non-orthodoxes (AQP-6, -8, -11 et -12) pour qui le rôle n'est pas encore défini (figure 11).

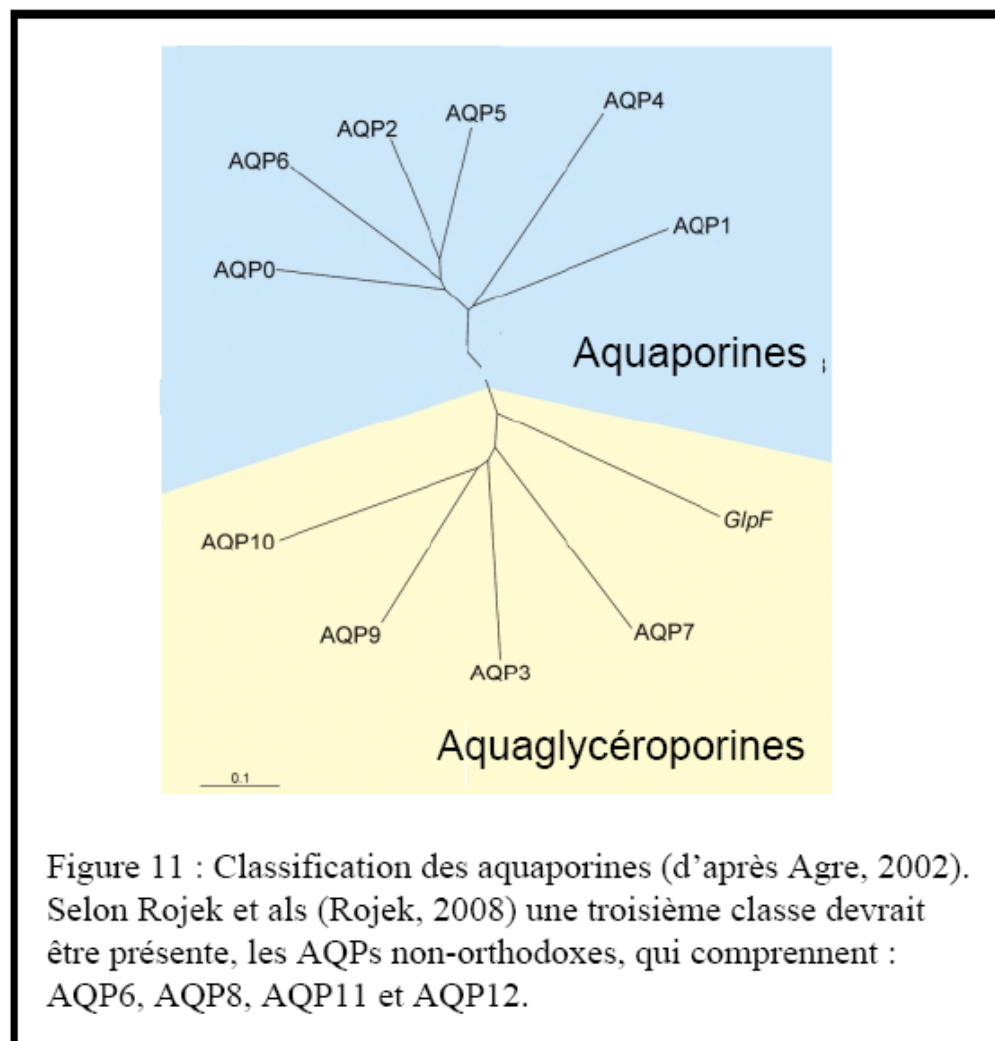


Figure 11 : Classification des aquaporines (d'après Agre, 2002). Selon Rojek et als (Rojek, 2008) une troisième classe devrait être présente, les AQPs non-orthodoxes, qui comprennent : AQP6, AQP8, AQP11 et AQP12.

### 1.5.3.1 Les aquaporines classiques

#### 1.5.3.1.1 AQP0

L'aquaporine 0 (AQP0), aussi appelé MIP (major intrinsic protein) est un canal à eau exprimé au pôle postérieur de la lentille de l'œil et dans les fibres nucléaires. La perméabilité de ce canal à eau est 40 fois plus basse que celle de l'AQP1, de plus, elle est régulée par le pH et par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Verkman, Ruiz-Ederra et al. 2008).

#### 1.5.3.1.2 AQP1

Des études d'expression d'AQP1 effectuées chez les ovocytes de *Xenopus laevis* ont permis de démontrer sa très grande perméabilité à l'eau associée à une imperméabilité à l'urée et aux protons (Zeidel, Ambudkar et al. 1992). L'AQP1 est exprimée dans le rein, les globules rouges, l'œil, des parties du système reproducteur mâle, la rate, la vessie, le foie, le plexus choroïde et les poumons (Mulders, van Lieburg et al. 1996). Il a été démontré que l'AQP1 facilite l'angiogenèse tumorale et la migration des cellules endothéliales (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008). Des études récentes suggèrent que chez les globules rouges, l'AQP1 pourrait être responsable du transport du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) gazeux (Endeward, Cartron et al. 2008).

#### 1.5.3.1.3 AQP4

L'aquaporine 4 (AQP4) est le canal à eau le plus important dans le cerveau. Elle joue un rôle important dans la pathophysiologie cytotoxique et l'œdème cérébrale vasogénique (Papadopoulos and Verkman 2007). De plus, elle est une des seules AQP à être insensible au mercure. L'AQP4 occupe un rôle dans le coupage fonctionnel entre l'eau et le transport de potassium et

l'homéostasie de glutamate répondant à l'activité neuronale du cerveau. Pendant ce processus, l'AQP4 est sous le contrôle de l'arginine-vasopressine (AVP) (Amiry-Moghaddam and Ottersen 2003). En plus du cerveau, l'AQP4 se retrouve aussi dans le rein, l'oeil, le poumon et l'intestin (Funaki, Yamamoto et al. 1998).

#### 1.5.3.1.4 AQP5

En 1995, l'aquaporine 5 (AQP5) a été clonée à partir de l'ADNc de la glande salivaire. On la retrouve aussi dans l'oeil, la glande lacrymale, le poumon et la trachée (Raina, Preston et al. 1995).

#### 1.5.3.2 Aquaglycéroporines

##### 1.5.3.2.1 AQP3

L'aquaporine 3 (AQP3) fut initialement identifiée dans le rein (Ishibashi, Sasaki et al. 1994). Des analyses de perméabilité effectuées dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* ont démontré qu'en plus d'une haute perméabilité à l'eau, cette isoforme d'aquaporine peut transporter le glycérol et l'urée (Echevarria, Windhager et al. 1994; Ishibashi, Sasaki et al. 1994; Yang and Verkman 1997). On retrouve l'AQP3 dans plusieurs tissus ce qui suggère qu'il joue un rôle physiologique important. Elle a été retrouvée dans le rein (Ishibashi, Sasaki et al. 1994), la peau (Ma, Hara et al. 2002), la conjonctive de l'œil (Hamann, Zeuthen et al. 1998), l'œsophage (Koyama, Yamamoto et al. 1999), le colon, la rate, l'estomac, le petit intestin, la vessie (Ishibashi, Sasaki et al. 1994) et le système respiratoire (Nielsen, King et al. 1997). Il a été démontré que la suppression du gène de l'AQP3 empêche la formation de tumeur au niveau de la peau grâce à un mécanisme qui réduirait le métabolisme de glycérol de cellules tumorales (Verkman, Hara-Chikuma et al. 2008).

#### 1.5.3.2.2 AQP7

L'aquaporine 7 (AQP7) a été découverte initialement dans les tissus adipeux et les testicules (Kishida, Kuriyama et al. 2000). Toujours via l'expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, on observe pour cette isoforme une bonne perméabilité à l'eau, au glycérol et à l'urée (Ishibashi, Kuwahara et al. 1997). Plusieurs études avancent que l'AQP7 aurait un rôle à jouer dans le métabolisme du glycérol, étant donné que le promoteur de son gène est sensible à l'insuline (Kishida, Kuriyama et al. 2000). L'AQP7 est aussi retrouvée dans le rein où elle est colocalisée avec l'AQP1 et possède la fonction de réabsorption de glycérol.

#### 1.5.3.2.3 AQP9

L'aquaporine 9 (AQP9) a été identifiée dans les leucocytes et le foie (Ishibashi, Kuwahara et al. 1998; Tsukaguchi, Shayakul et al. 1998). Exprimée dans les ovocytes de *Xenopus laevis* on observe pour cette isoforme une perméabilité à l'eau plus modeste que celle d'autres aquaporines, telle l'AQP4 (Carbrey, Gorelick-Feldman et al. 2003). Chez le rat, l'AQP9 confère une perméabilité à une vaste variété de solutés non chargés (Tsukaguchi, Shayakul et al. 1998). L'AQP9 est abondamment exprimée dans le foie, l'épididyme, la peau, le système reproducteur (Rojek, Skowronski et al. 2007) et les organes où il y a accumulation de leucocytes, comme la moelle osseuse et la rate (Takata, Matsuzaki et al. 2004).

#### 1.5.3.2.4 AQP10

L'aquaporine 10 (AQP10) présente une forte homologie de structure avec l'AQP3 et 9 (Hatakeyama, Yoshida et al. 2001). Exprimée dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, on n'observe qu'une faible perméabilité à l'eau, sans aucune

perméabilité au glycérol et à l'urée. L'AQP10 est retrouvé presque exclusivement dans la section proximale du petit intestin, bien que l'ARNm ait été détecté dans les muscles, les gencives et chez les dents en croissance (Wang, Hart et al. 2003).

### 1.5.3.3 Aquaporines non-orthodoxes

#### 1.5.3.3.1 AQP6

L'aquaporine 6 (AQP6) identifiée en 1993 (Ma, Frigeri et al. 1993). Elle possède aussi les deux sites NPA classiques et est l'aquaporine la plus similaire à l'AQP2. Injectée dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, une perméabilité à l'eau est observée sans aucune activité de transport d'urée et de glycérol. L'AQP6 de souris et de rat ont été décrits comme de mauvais canaux à eau, mais forment d'excellent canaux à anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,...) (Nagase, Agren et al. 2007). Cette isoforme est retrouvée principalement dans les reins (Ma, Yang et al. 1996).

#### 1.5.3.3.2 AQP8

L'aquaporine 8 (AQP8) identifiée en 1997, possède les deux sites NPA et présente une grande homologie de structure avec l'aquaporine des plantes  $\gamma$ TIP. Chez l'humain, l'AQP8 possède des propriétés de perméabilité similaires à l'AQP1 (Koyama, Yamamoto et al. 1997) et est uniquement détectée dans les testicules et le pancréas (Koyama, Ishibashi et al. 1998). L'AQP8 de souris, par contre, est perméable à l'urée mais non au glycérol.

#### 1.5.3.3.3 AQP11

L'aquaporine 11 (AQP11) est exprimée dans les testicules, le foie, le rein (Morishita, Matsuzaki et al. 2005), le cerveau, les intestins, le cœur et les tissus adipeux (Gorelick, Praetorius et al. 2006). Malheureusement les différentes études d'expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis* n'ont pas donné de résultats concluants quant à ses propriétés de transport (Gorelick, Praetorius et al. 2006; Yakata, Hiroaki et al. 2007).

#### 1.5.3.3.4 AQP12

L'aquaporine 12 (AQP12), homologue à l'AQP8, est retrouvée dans le pancréas (Itoh, Rai et al. 2005). Malheureusement, aucune caractérisation de cette isoforme n'a pas été publiée jusqu'à présent.

### 1.5.4 AQP2

#### 1.5.4.1 Synthèse

La transcription de l'AQP2 et la traduction qui en découle sont essentiellement régulés par la vasopressine (Hasler, Nielsen et al. 2006). Celle-ci stimule la transcription via une séquence CRE (« cAMP responsive element ») présente dans le promoteur du gène, conférant au tubule collecteur une adaptation à long terme face à une privation d'eau. En accord avec ce mécanisme d'action, l'action stimulatrice de l'AMPc ou encore de la forskoline sur la perméabilité de l'AQP2 sauvage a été démontrée depuis longtemps (Kuwahara, Fushimi et al. 1995). Par ailleurs, il a démontré que la stimulation de l'AMPc induite par la vasopressine provoque la phosphorylation de CREB via une Epac (« exchange protein directly activated by cAMP ») et une ERK (« extracellular signal-regulated kinase ») (Umenishi, Narikiyo et al. 2006).

De plus, une étude récente démontre que l'adressage d'AQP2 stimulé par AMPc dépendrait des éléments PKA et Epac. La coopérativité de ces deux voies de signallement dans la régulation de l'exocytose a été démontré lors de l'exocytose de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Kang, Joseph et al. 2003). Dans des lignées cellulaires transfectées avec l'AQP2, la phosphorylation du résidu sérine à la position 256 (Ser256) de l'AQP2 par la PKA est nécessaire à l'exocytose induite par l'AMPc (Katsura, Gustafson et al. 1997). Il a été démontré que la phosphorylation dépendante de PKA et la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de Epac sont des processus importants lors de la stimulation de l'AQP2 médiée par l'AVP (Yip 2006).

De plus, l'augmentation de l'hypertonie, via le facteur de transcription TonEBP/OREBP/NFAT5 et son ligand TonE (« tonicity-responsive enhancer ») induit la transcription de plusieurs gènes, dont l'AQP2 (Ferraris and Burg 2006).

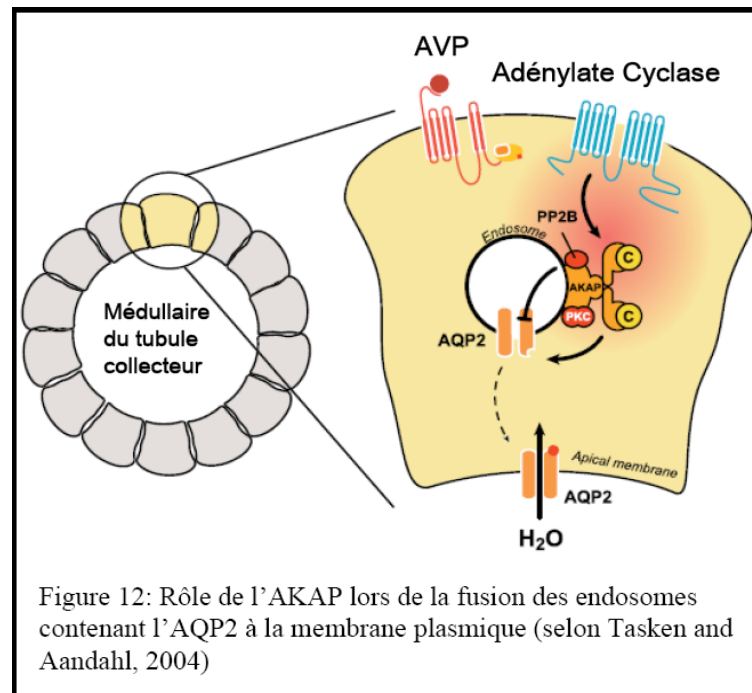
#### 1.5.4.2 Transport intracellulaire

Généralement, les protéines membranaires possèdent des signaux intégrés dans leur structure qui déterminent leur distribution cellulaire (Sasaki and Noda 2007). À l'égard de l'expression rénale de l'AQP2, sa destination finale est la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. Après la synthèse au réticulum endoplasmique (RE), les protéines AQP2 sont transférées au travers du Golgi, le réseau trans-Golgi (RTG), et emmagasinées dans des vésicules cargo naissantes. Le transport du RE à la membrane apicale peut être divisé en deux étapes, soit le transport du RE aux vésicules de stockage localisées à la région subapicale en un premier temps, suivi par le transport des vésicules de stockage à la membrane apicale (Sasaki and Noda 2007).

#### 1.5.4.3 Fusion d'AQP2 à la membrane apicale

La fusion des vésicules de stockage d'AQP2 avec la membrane apicale s'accomplit via une séquence d'événements bien orchestrés. La phosphorylation de l'AQP2 à la sérine 256 (S256) est l'élément initiateur de l'adressage de l'AQP2. La vasopressine semble augmenter la quantité d'AQP2 S-256-phosphorylée (Hoffert, Pisitkun et al. 2006) principalement via la PKA mais possiblement aussi par l'action d'autres kinases telles la protéine kinase G (PKG), la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase II qui possèdent toutes des sites de phosphorylation dans la séquence d'AQP2 (Bouley, Pastor-Soler et al. 2005). Puisque la PKA et ses substrats sont distribués également d'un bout à l'autre de la cellule, son positionnement à un site localisé devient fondamental à l'obtention d'une activation spécifique. Ce processus est assuré par l'intermédiaire des « AKAPs » (PKA anchoring proteins ) qui relient la PKA à un site spécifique et limite du même coup son accès à ses substrats (Tasken and Aandahl 2004). Cette liaison de PKA à AKAPs fut démontré comme étant un pré-requis à la fusion des vésicules d'AQP2 avec la membrane apicale (Henn, Stefan et al. 2005) (figure 12).





Aussi, on assiste à la réorganisation du cytosquelette d'actine sous la membrane apicale. Il a été établi que la vasopressine provoque la dépolymérisation de l'actine-F apicale, ce qui induit la fusion des vésicules d'AQP2 avec la membrane apicale (Simon, Gao et al. 1993). Notons que cette interaction actine-AQP2 a aussi été démontrée (Noda, Horikawa et al. 2004).

Plusieurs études ont aussi démontré le rôle du calcium dans l'adressage de l'AQP2 médié par la vasopressine. La liaison de la vasopressine à son récepteur V2 déclenche une accumulation rapide du calcium intracellulaire, qui stimule l'adressage apicale de l'AQP2 (Chou, Yip et al. 2000). Dans ce cas-ci, la médiation serait imputable à Epac et non pas la PKA (Yip 2006).

La machinerie moléculaire pour l'arrimage et la fusion des vésicules possédant l'AQP2 avec la membrane apicale est similaire au processus de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique qui implique les SNAREs associées aux vésicules et les SNAREs associées aux membranes. La

présence des SNAREs associés avec les vésicules de sécrétions a été démontré par des études de clivage de SNAREs qui abolissent la fusion (Gouraud, Laera et al. 2002).

L'adressage apical ciblé de l'AQP2 suggère l'existence de protéines qui recruteraient l'AQP2 par liaison directe protéine-protéine. Bien que plusieurs protéines soient co-localisées avec l'AQP2 dans les vésicules de sécrétions, très peu parmi celles-ci ont été identifiées comme leur étant directement associées. SPA-1 est une « GTPase-activating protein » (GAP) spécifique pour Rap1 et elle a été identifiée comme étant nécessaire à l'adressage à la membrane apicale de l'AQP2 (Noda, Horikawa et al. 2004).

#### 1.5.4.4 Endocytose et dégradation

Lors de l'endocytose, il y a accumulation d'AQP2 dans des puits enrobés de clathrine puis internalisation via un processus médié par celles-ci. Après l'internalisation, l'AQP2 se retrouve dans les endosomes précoces puis dans les vésicules de stockage contenant Rab11. Ce type de vésicules de stockage spécifique à l'AQP2 permet, si nécessaire, leur recyclage à la membrane apicale grâce à la stimulation de la vasopressine et de Rab11 (Tajika, Matsuzaki et al. 2005).

L'ubiquitination sur la lysine à la position 270 (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006) est le signal par lequel s'initie l'endocytose et le transport de l'AQP2 vers les protéasomes pour y être dégradée (Mukhopadhyay and Riezman 2007). Des études ont démontré qu'il y avait une augmentation de l'ubiquitination de l'AQP2 suite au retrait de la vasopressine ou à l'arrêt de stimulation de la PKC indiquant ainsi que son ubiquitination est un processus régulé (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006). De plus, il est possible que les endosomes contenant

l'AQP2 soit sécrétés sous forme de petites vésicules membranaires d'origine endocytaire dans l'urine (Pisitkun, Shen et al. 2004).

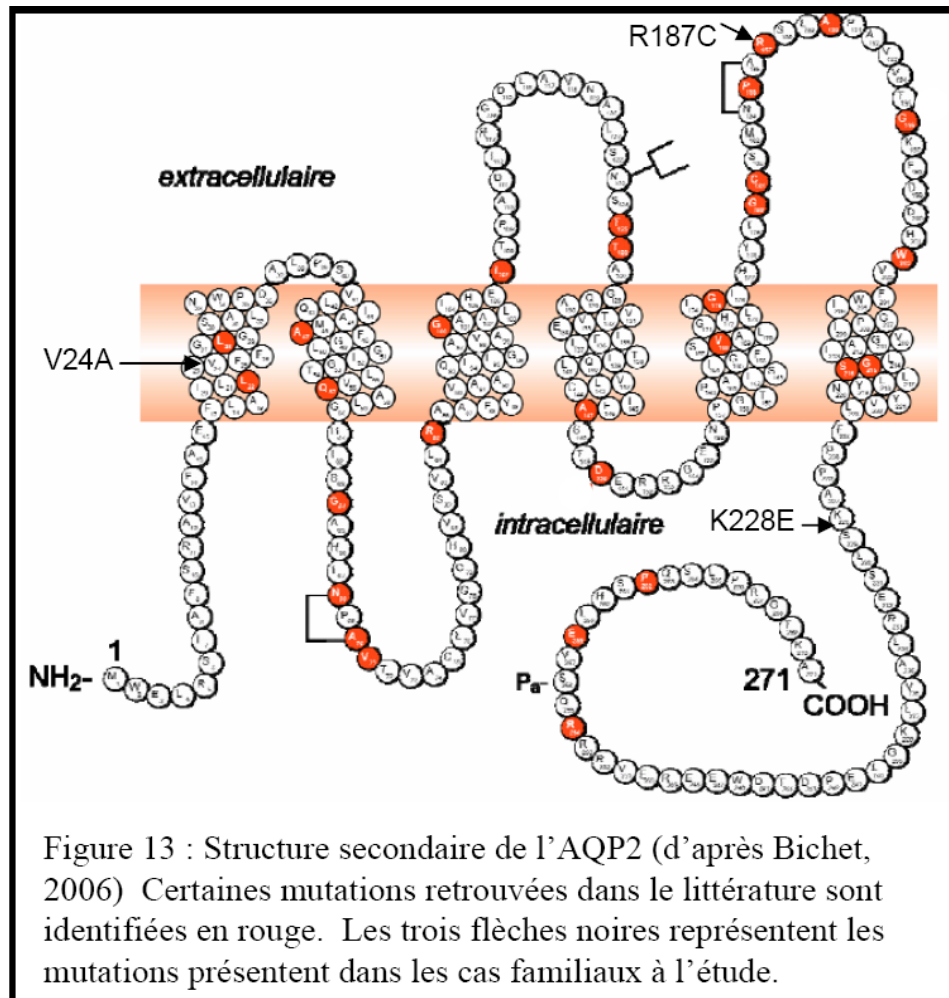
#### 1.5.4.5 Mutations

Le groupe de Deen a été le premier à définir les mutations sur le gène codant pour l'AQP2 comme étant responsable du DIN autosomique chez l'humain (Deen, Croes et al. 1995). À ce jour, 41 mutations (voir Tableau I) ont été recensées et leur phénotype varient de faible à sévère. Parmi celles-ci, 10 sont fonctionnelles dans des modèles cellulaires en culture bien qu'à l'origine d'un DIN chez des patients. Sept de ces mutants sont à caractère dominant (721delG, 727delG, R254L, 763-772del, E258K, 779-780insA et 812-818del) et trois sont à caractère récessif (A147T, D150E et P262L) car elles présentent un phénotype partiel. Chez les 33 autres mutants une perméabilité osmotique ( $P_f$ ) réduite est observée en comparaison à la protéine de type sauvage (Robben, Knoers et al. 2006).

Le trafic intracellulaire des mutations récessives diffère des protéines de la forme sauvage. En général, les mutations récessives induisent un mauvais repliement de la protéine. Ces formes non fonctionnelles ne peuvent se rendre à la membrane plasmique et seront ainsi plutôt, dirigées vers des vésicules de dégradation. Parfois la protéine mutée peut être retenue au RE grâce à un système de chaperonnes (Marr, Bichet et al. 2002). Par contre il semble bien qu'il n'y ait pas de multimérisation entre les mutants récessifs et la forme sauvage de l'AQP2 (Shi, Cao et al. 2007). Les mutations dominantes causant le DIN se situent généralement sur la portion C-terminale de la protéine qui, elle, est responsable de son insertion dans la membrane apicale (Robben, Knoers et al. 2006; Shi, Cao et al. 2007). L'hétéromérisation des mutations dominantes négatives avec la forme sauvage cause la séquestration du complexe dans la cellule (Kamsteeg, Wormhoudt et al. 1999). Dans certains cas, l'interaction des

mutations dominantes avec les formes sauvages provoque le mauvais ciblage du complexe vers la membrane basolatérale au lieu de la membrane apicale (Kamsteeg, Bichet et al. 2003).

Il a été démontré que les mutations T126M et E258K qui restent séquestrées dans l'appareil de Golgi sont dégradées dans les protéasomes (Hirano, Zuber et al. 2003). De plus, la mutation E258K, tout comme les mutations causées par le déplacement du cadre de lecture de +1, peut être dégradée dans le lysosome via les endosomes tardifs (Kuwahara, Iwai et al. 2001; Hirano, Zuber et al. 2003). Lorsque les mutants sont séquestrés dans le RE des cellules rénales, ceux-ci ne peuvent être stimulés en présence de forskoline. Par ailleurs, un individu atteint du DIN pourrait ne pas excréter l'AQP2 mutée dans l'urine puisque celle-ci se retrouve séquestrée dans le RE (Iolascon, Aglio et al. 2007).



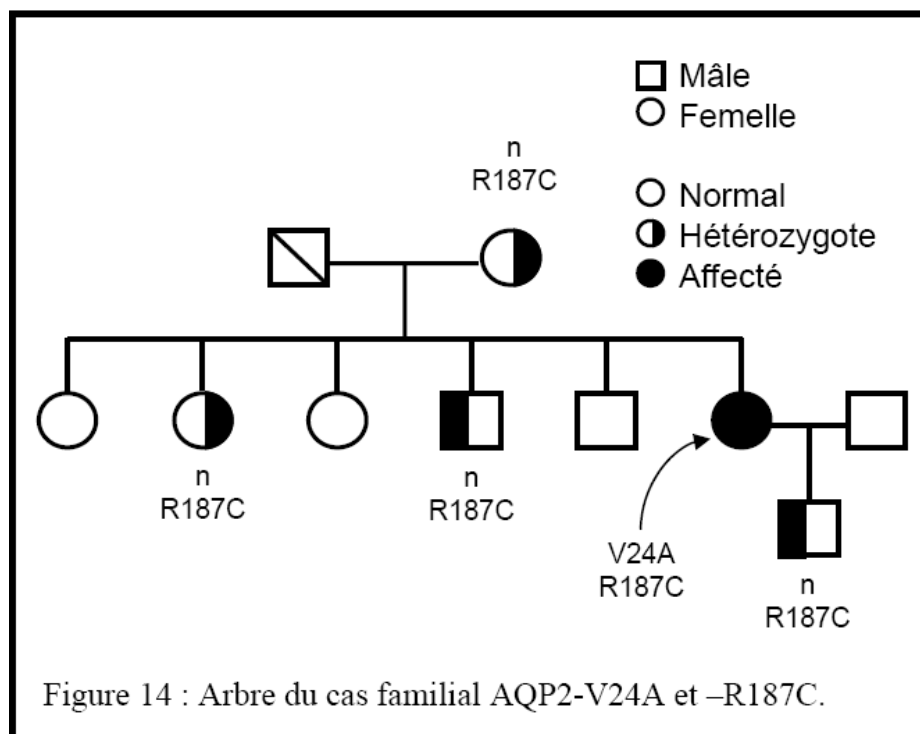
#### 1.5.4.6 Mutants V24A, D150E, R187C, G196D et K228E

Les mutations étudiées ont toutes été retrouvées chez des patients référés au Dr Daniel G Bichet présentant des signes de DIN. À la suite du séquençage de leur gène codant pour l'AQP2 les mutations ont été identifiées (figure 13).

Les mutations D150E et G196D ont été identifiées chez une patiente d'origine espagnole née en 1999. Elle est atteinte de polyurie sévère accompagnée d'épisodes de déshydratation hypernatrémique à l'âge de 3, 5 et 8 mois. L'osmolarité urinaire basale est de 77 mmol/kg et présente un génotype

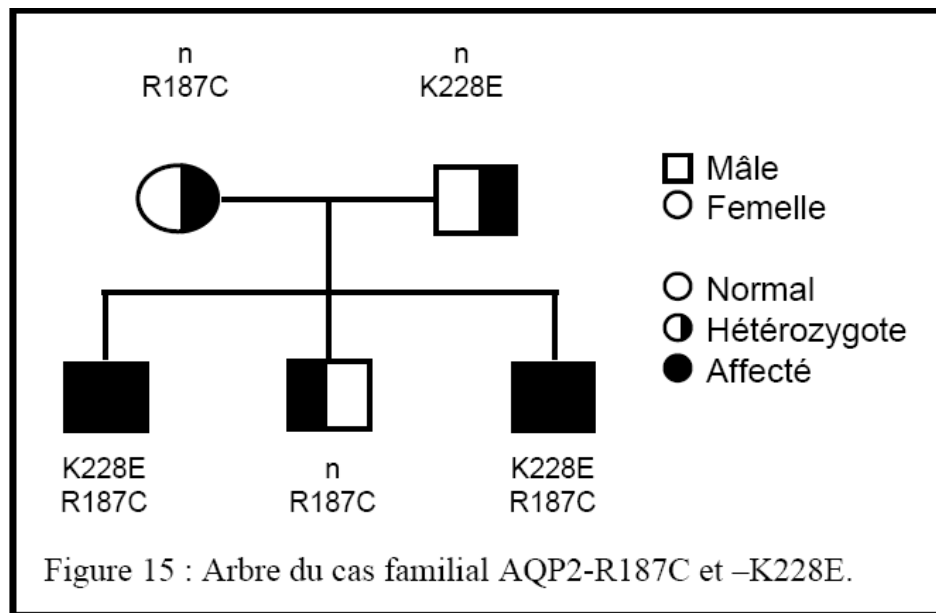
hétérozygote où un allèle possède la mutation D150E, et l'autre G196D. Des études préliminaires ont démontré que le mutant D150E possède une fonctionnalité partielle, contrairement au mutant G196D qui ne présente aucune fonctionnalité (Lussier, Bissonnette et al. 2005).

Les mutations V24A et R187C ont été identifiées chez une patiente âgée de 39 ans. Elle présente une polyurie et polydipsie accompagnées d'épisodes de déshydratation depuis l'enfance et une osmolalité urinaire de 106 mOsm/kg. Encore une fois, il s'agit d'un génotype hétérozygote où un allèle possède la mutation V24A, et l'autre R187C. La mutation R187C a déjà été répertorié dans la littérature en 1998 (Mulders, Bichet et al. 1998) (figure 14).



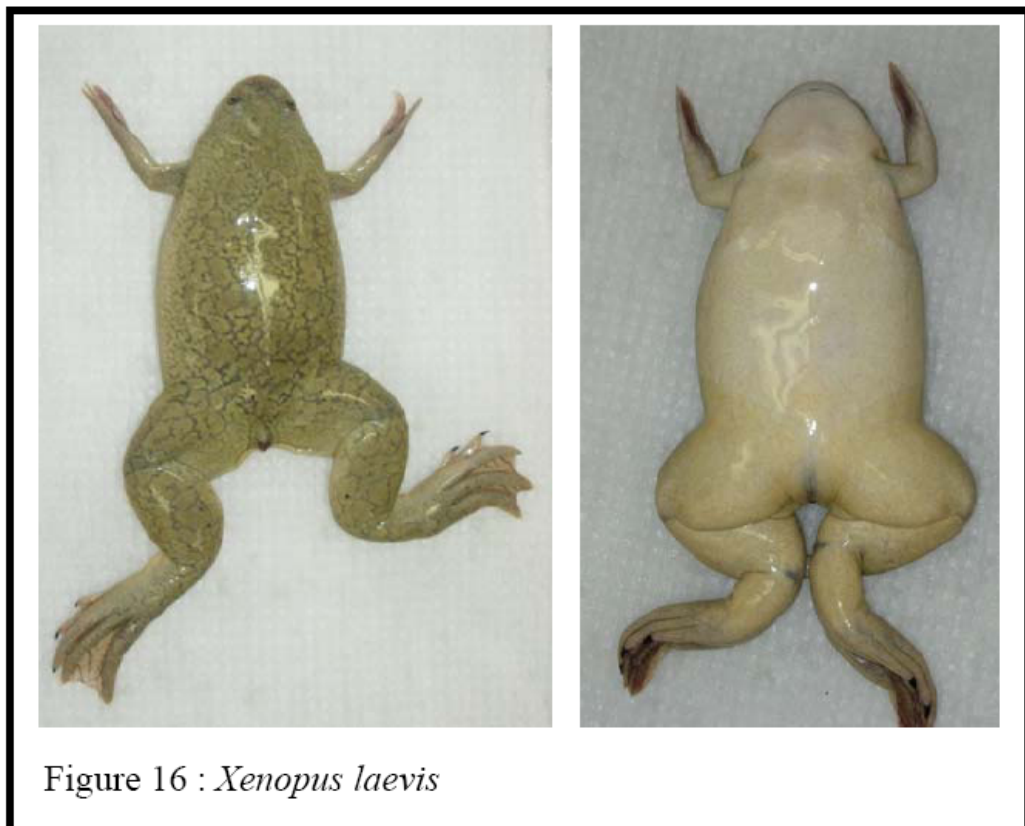
Les mutations R187C et K228E ont été quant à elles identifiées chez deux enfants d'une même famille présentant un phénotype modéré-sévère. Des épisodes de fièvre et de déshydratation ont été observés pour la première fois à

l'âge de 3 et 4 mois ainsi qu'une faible capacité à concentrer l'urine avec des osmolalités urinaires de 219 et 174 mOsm/kg. Encore une fois, il s'agit d'un génotype hétérozygote combinant ces deux mutations (figure 15).



### 1.6 *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis*, aussi appelé dactylère du Cap, est une grenouille d'Afrique du Sud de couleur terne et dépourvue de langue (figure 16). Ses pattes postérieures sont palmées et munies de griffes cornées. Les mâles peuvent atteindre une longueur de sept à dix centimètres et les femelles de douze à quatorze centimètres.



#### 1.6.1 Historique

Les ovocytes de la grenouille *Xenopus laevis* ont été initialement utilisés dans les années 1950 par John Gurdon (Gurdon 1960). Le projet consistait à remplacer le noyau d'origine par un noyau embryonique. Les ovocytes de



*Xenopus laevis*, étant plus permissifs, ont permis de démontrer que le matériel génétique n'est pas nécessairement altéré lors de la spécialisation cellulaire pendant le développement embryonnaire. Ce concept a influencé les études sur les cellules souches. Dans les années 1960 (Brown 2004), des études sur l'ADN contenu dans les ovocytes ont permis de démontrer que les mitochondries sont héritées de la mère. Mais, c'est en 1971 que le groupe de Gurdon (Gurdon, Lane et al. 1971) a démontré les avantages de ce système comme modèle de synthèse protéique *in vivo* en injectant l'ARNm de globine de lapin dans un ovocyte. Les ovocytes ont synthétisé et emmagasiné pendant des jours les protéines étrangères. Les grandes qualités de l'ovocyte, dont sa taille et sa manipulation aisée pour l'injection de matériel génétique, en ont rapidement fait un modèle de choix pour les études de physiologie cellulaire et de biologie moléculaire. De plus, la validation de ce modèle pour l'adressage adéquat des protéines injectées, tel que démontré par des études de protéines marquées (Gurdon 1970), a permis l'investigation de protéines mutées afin d'observer leur sécrétion (Krieg, Strachan et al. 1984) et leur localisation cellulaire (Dingwall, Sharnick et al. 1982). En 1992, les ovocytes ont été un outil crucial dans la mise en évidence de l'existence même des aquaporine (Preston, Carroll et al. 1992), en démontrant une perméabilité à l'eau spécifique à certains ARNm injectés, allant même jusqu'à les faire exploser lorsque ceux-ci baignent dans un milieu hypotonique.

### 1.6.2 Ovocytes

Les ovocytes de *Xenopus laevis* possèdent deux pôles, l'un dit végétal et l'autre animal. De plus, au-delà leur membrane plasmique, les ovocytes sont enrobés d'une membrane vitelline. Ils possèdent un diamètre moyen de 1 mm, ce qui en facilite la manipulation. Ils sont perméables aux petites molécules. De plus, ils possèdent une machinerie de translation équivalente à 50 000 cellules somatiques (Brown and Littna 1964) ce qui leur permet de synthétiser

activement les protéine. De plus, les protéines synthétisées sont ciblées adéquatement et sont fonctionnelles. Leurs compartiments intracellulaires ont une taille si grande qu'ils sont accessibles au biologiste moléculaire pour des fins de manipulations et visualisations. Avant d'atteindre la maturité les ovocytes passent par six stades. Les stades I et II consistent à la formation du cytosquelette et des différentes organelles intracellulaires. Les stades III et IV consistent à l'apparition de pigments sombres qui formeront le pôle animal et l'accumulation de grande quantité de vitellus qui formeront le pôle végétal. Au stade VI, les ovocytes ont complété la formation de leurs membranes et organelles (Sardet, Prodon et al. 2002). Ils sont faciles à isoler grâce à une simple opération qui consiste à retirer les sacs ovariens de la grenouille femelle nature et d'en détacher manuellement les ovocytes. Lorsqu'il est possible, la grenouille est recousu afin d'être utilisée une prochaine fois, lorsqu'elle aura récupéré de la première chirurgie. Ensuite, la membrane folliculaire est retirée par une digestion à la collagénase. Suite à leur isolation, les ovocytes peuvent aisément survivre 2 semaines dans un milieu de culture simple. Ils sont fréquemment utilisé en tant que système d'expression dans les études d'expression de protéines membranaires (Gurdon and Melton 1981).

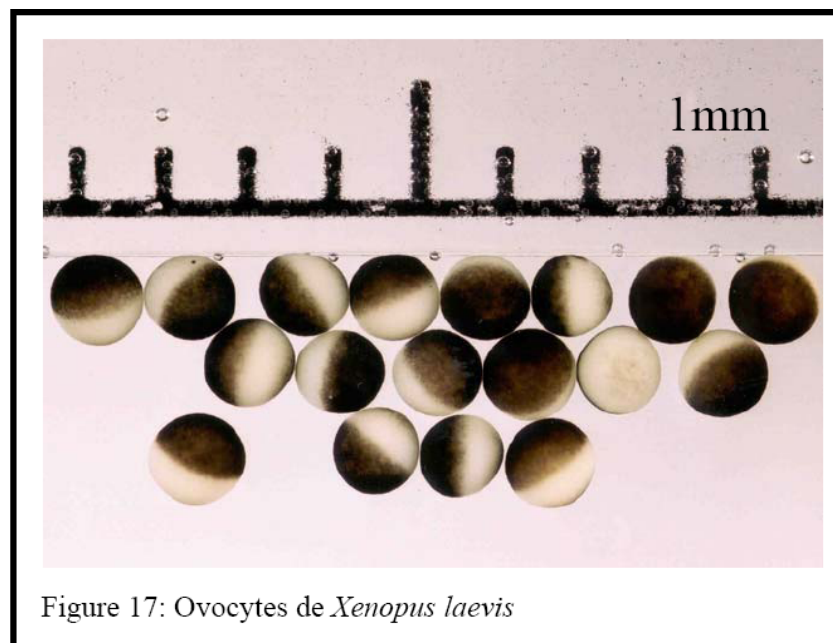


Figure 17: Ovocytes de *Xenopus laevis*

### 1.6.3 Techniques de purification

L'étude détaillée des protéines membranaires requiert la possibilité de purifier les membranes plasmiques. Chez les ovocytes de *Xenopus laevis*, une des premières techniques utilisées consistait à enlever manuellement l'enveloppe vitelline suite à un rétrécissement cellulaire induit par un choc hypertonique (Wallace, Ho et al. 1973). En 1980, le groupe de Richter (Richter 1980) utilisait des tamis de nylon afin de séparer la membrane vitelline de l'homogénat d'ovocytes. Cet homogénat était ensuite soumis à des centrifugations de faible vitesses, afin d'obtenir les membranes plasmiques et les fragments de cortex. En 1989, le groupe de Wall et Patel (Wall and Patel 1989) a développé une technique de purification qui consistait à former des complexes avec l'enveloppe vitelline, la membrane plasmique et les granules corticaux. À la suite de délicates homogénéisations, ils purifiaient les complexes de membranes plasmiques par simple décantation. En 2001, Kamsteeg et Deen (Kamsteeg and Deen 2001) ont développé une technique qui consiste à enlever manuellement la membrane vitelline à l'aide de pinces et à incuber les ovocytes dans des solutions Ludox et d'acide poly acrylique afin d'envelopper la membrane plasmique de silice chargée positivement.

Malgré les nombreuses techniques de purification de membrane plasmique déjà proposées, il est toujours difficile d'obtenir une quantité de matériel suffisante à un taux de pureté raisonnable sans pour autant avoir recours à une manipulation ardue (dévitellinisation manuelle).

### 1.7 Objectifs

Comme mentionné précédemment, l'ovocyte de *Xenopus laevis* est un modèle fréquemment utilisé lors d'études de protéines membranaires. Depuis les années 70, plusieurs techniques ont été élaborées afin d'isoler les membranes plasmiques des organelles intra-cellulaires. Malgré l'évolution des techniques au fil des années, aucune ne permettait d'isoler facilement et en une demi-journée un lot de 10 à 120 ovocytes. Il était devenu nécessaire de développer une telle technique afin de poursuivre nos études sur l'aquaporine-2. La technique que nous proposons se base en fait sur deux techniques préexistantes, la première qui consiste à effectuer une digestion enzymatique partielle de la membrane vitelline par l'enzyme subtilisine A, une technique de perméabilisation de la membrane qui a été initialement élaborée pour permettre l'application de la technique de « patch-clamp » aux canaux exprimés dans les ovocytes (Choe and Sackin 1997). La deuxième a pour but de créer un complexe polymérisé associant les membranes vitelline et plasmique grâce à un traitement séquentiel avec une solution de Ludox 1% et d'acide polyacrylique 0.1%(Kamsteeg and Deen 2001). Nous croyons que le jumelage des deux techniques va permettre l'obtention d'une technique facile, rapide et efficace.

Comme énoncé précédemment, les mutations V24A et R187C sont observées chez une patiente de 39 ans tandis que les mutations K228E et R187C se retrouvent chez deux membres d'une même famille. La mutation R187C a déjà été répertoriée dans la littérature en 1998 (Mulders, Bichet et al. 1998). Elle a été définie comme étant non-fonctionnelle et absente de la membrane plasmique. Les mutations V24A et K228E non jamais été répertoriées dans le passé. Le but de l'étude, dans un premier temps, est d'évaluer la fonctionnalité des nouvelles protéines mutantes par des études de perméabilité et par des essais d'immunobuvardage des protéines de la membrane plasmique. Ensuite, la présence à la membrane plasmique sera évaluée par des expériences

d'immunofluorescence effectuée dans des cellules de type mIMCD-3. Finalement, nous tenterons d'observer les interactions des différentes mutations lorsqu'elles sont co-exprimées dans les ovocytes.

## 2. Résultat

### 2.1 « Elaboration of a novel technique for purification of plasma membrane from *Xenopus laevis* oocytes »

Alexandre LEDUC-NADEAU<sup>1</sup>, Karim LAHJOUI<sup>1-2</sup>, Pierre BISSONNETTE<sup>1-2</sup>, Jean-Yves LAPOINTE<sup>1</sup> and Daniel G. BICHET<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), département de Physiologie, Université de Montréal, and <sup>2</sup>Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Référence : Leduc-Nadeau A., Lahjouji K., Bissonnette P., Lapointe J-Y, Bichet D.G. « Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from *Xenopus Laevis* oocytes ». *Am J Physiol Cell Physiol* 292:1132-1136, 2007. First published Nov 1, 2006

Contribution des auteurs : Toutes les figures obtenues proviennent de manipulation effectuées par le premier auteur. De plus, l'article est basé sur le rapport de stage de ce dernier. Le Dr Lahjouji a participé à la mise en place des paramètres initiaux en plus de fournir un soutien technique au premier auteur. Le Dr Bissonnette est derrière l'idée de combiner les 2 techniques préexistantes en plus d'offrir un excellent soutien technique et théorique. Finalement, sans le soutien important du Dr Lapointe et du Dr Bichet, le tout n'aurait pu être possible.

## ABSTRACT

Over the past two decades, *Xenopus laevis* oocytes have been widely used as an expression system to investigate both physiological and pathological properties of membrane proteins such as channels and transporters. Past studies have clearly shown the key implication of mistargeting in relation to the pathogenesis of to these proteins. In order to unambiguously determine the plasma membrane targeting of a protein, a thorough purification technique becomes essential. Unfortunately, available techniques are either too cumbersome, technically demanding, or require large amounts of material, all of which are not adequate when using oocytes individually injected with cRNA or DNA. In this paper, we present a new technique which permits excellent purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. This technique is fast, does not require particular skill, such as peeling of vitelline membrane, and permits purification of multiple samples from as few as ten and up to more than a hundred oocytes. The procedure combines partial digestion of the vitelline membrane, polymerization of the plasma membrane and low speed centrifugations. We have validated this technique using essentially Western blots assays on three plasma membrane proteins (AQP2, SGLT1 and TRPV5) using both wild type and mistargeted forms of the proteins. Purified plasma membrane fractions were easily collected and samples were found to be adequate for Western blot identification.

Keywords: Plasma membranes, expression studies, *Xenopus* oocytes, AQP2 mutations

## INTRODUCTION

*Xenopus laevis* oocytes have been widely used as means for the cloning and characterization of heterologous proteins from sources as diverse as viruses, bacteria, plants and animals, (16, 17, 19). More particularly, the use of oocytes have been extremely fruitful in expression cloning of channels and transporters, taking advantage of sensitive techniques such as electrophysiology and radiotracer uptakes (6, 12, 16, 20). Rapidly, the use of oocytes has expanded to include physiological and biochemical characterization of heterologous proteins which often led to the identification of pathological mechanisms associated with naturally occurring mutations. More specifically, the topic of targeting, which turns out to be of highest importance in transporter and channel related pathologies, has been addressed using oocytes (7, 15). Adequate plasma membrane targeting is essentially demonstrated by positive functionality and/or by using immunolabelling techniques such as immunofluorescence. Definite characterization is strengthened by studies on purified plasma membrane fractions using Western blots or other biochemical analysis. Unfortunately, existing techniques allow for partial purification of plasma membrane fractions (11) or require laborious steps implying manual removal of vitelline membranes (5, 14), which is cumbersome and severely limits the number of oocytes that can be treated in a reasonable experiment. Recently, a new technique using centrifugation on density gradient have been proposed (13). Unfortunately, this technique was designed for a large number of oocytes (400 to 1000) which is therefore not applicable with expression studies requiring individually injected oocytes. It thus became desirable to design a new technique which could generate highly purified plasma membrane fractions from oocytes, one that would be both rapid and easy, and which could be performed in reasonable batches of injected oocytes.

The present paper describes a new technique which was elaborated from the combination of three already existing techniques and allows a high level of purification of plasma membrane fractions from *X. laevis* oocytes. The technique



combines partial digestion of the vitelline membrane, polymerization of the plasma membrane and low speed centrifugations of large plasma membrane leaflets. This technique allows for simultaneous processing of multiple samples from 10 to more than 100 oocytes and can be used for proteins that are more faintly expressed at the plasma membrane. The purified fractions can be efficiently used for biochemical characterizations of proteins using as Western blots.

## MATERIAL AND METHODS

### *Oocyte preparation, injection and maintenance*

Ovary nodes were surgically removed from gravid *Xenopus laevis* frogs anaesthetised using 2-aminobenzoic acid ethyl ester. Oocytes (stage V-VI) were dissected by hand and follicular layers were removed using a collagenase treatment (17.5 mg/ml, Type 1A, Sigma-Aldrich) for 1 hour under mild agitation in a  $\text{Ca}^{++}$  free Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgSO}_4$ , and 5 HEPES pH 7.6). Oocytes were let to rest overnight at 18°C in normal Barth's solution (same as above with 0.4 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) supplemented with horse serum (5%), sodium pyruvate (2.5 mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin and 0.1mg/ml kanamycin). On the next day, oocytes were injected with cRNA solutions in water and further incubated for two (AQP2 and TRPV5) or five (SGLT1) days before proceeding to membrane purification. cRNA preparations were diluted to 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (except wt-AQP2 which was at 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for Western blots and 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  for functionality assays) and injected with 46 nl per oocyte using a microinjection apparatus (Drummond Scientific, Broomall, PA).

### *Vectors and cRNA*

All constructs used in this study were elaborated using the pT7Ts vector. For AQP2, the wild-type protein (wt-AQP2) construct was kindly provided by Peter M.T. Deen. The two point mutations, D150E and G196D, were inserted using site-directed mutagenesis and validity of constructs was confirmed through sequencing. For SGLT1, a fully functional myc-tagged version of the protein was used (1) along with two non-functional SGLT1 mutants, C351A and C361A (10). Vectors for TRPV5, wild-type and mutants (N518C and F531C), were kindly provided by L. Parent (8). For preparation of cRNAs, all vectors were linearized and cRNAs were synthesized using the mMessage mMachine T7 kit (Ambion, Austin, TX).

*Preparation of total and plasma membranes fractions of oocytes*

*Total membranes:* five oocytes were rinsed in Barth's solution and homogenized in 1 ml of the same solution supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma- Aldrich) with 10 strokes of a potter evenjem tissue grinder (Wheaton). Homogenates were centrifuged at 250 x g for 10 minutes at 4°C to discard cell debris and supernatant centrifuged at 16,000 x g for 20 minutes at 4°C to pellet down total membranes. Pellets were resuspended in 10µl Barth's (2 µl solution / oocyte) and frozen until use.

*Plasma membranes:* 40 oocytes (except in figure 1 where 10 to 120 oocytes were treated) were rinsed in MBSS (80mM NaCl, 20 mM MES pH 6.0) and incubated 10 minutes at room temperature in the same solution with 0.005% subtilisin A (Sigma- Aldrich) under very mild agitation to partially digest the vitelline membranes. From this moment on, oocytes are somewhat sticky although resistant enough to tolerate subsequent treatments. The following polymerizing steps were performed at 4°C under mild agitation. Polymerization is performed by two sequential 60 minutes incubations in MBSS, first with 1% ludox, then with 0.1% polyacrylic acid (Sigma-Aldrich). Between each step, oocytes were thoroughly rinsed in MBSS. The oocytes are then homogenised in an eppendorff tube with 0.5ml cold HbA (in mM: 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 EDTA, 80 sucrose and 20 Tris pH 7.4). This homogenisation is performed by hand with a P200 pipettor until no particles (dark granules) are visible (around 15 pipettings). This produces a homogeneous solution containing large leaflets of plasma membranes attached to vitelline membranes which will become visible after subsequent centrifugation steps. The homogenates were raised to 1.5 ml with HbA and centrifuged at 16 x g for 30 sec at 4°C. The supernatants were removed, leaving the bottom 75 to 100 µl, which contains the plasma membranes, and diluted again with 1 ml cold HbA. The tubes were centrifuged again at same speed, top 1 ml supernatant were removed and replaced again with the same amount of fresh HbA. At this moment, large leaflets should become visible when tipping the tube. With the same procedure, the tubes are centrifuged once at 25 x g then at 35 x g, with membranes always visible

in each pellet. A final centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes will pellet the purified plasma membranes which are resuspended in 10ul HbA and frozen until use.

### *Western blots*

Western blots were performed as described previously (1) using total membranes and purified plasma membranes isolated from *X. laevis* oocytes. Samples loaded represent either 1 oocyte (total membranes) or 40 oocytes (purified plasma membranes) except for figure 1 where the number of oocytes varied from 10 to 120. For TRPV5 and SGLT1, total membranes fractions were solubilized in 1% Triton in order to eliminate a major contaminating band of equivalent MW which alters the normal migration of both proteins analyzed. Interestingly, this contaminant is not found in purified plasma membrane. Samples were run either on a 7.5% (ECaC and SGLT1) or a 12% (AQP2) gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T (TBS + Tween 20, 0.1%) and probed with specific antibody. For AQP2, we used  $\alpha$ -AQP2 1/100 (N-20 from Santa Cruz Biotech, CA) followed by HRP-linked chicken anti-goat 1/ 5000 (Santa Cruz Biotech,CA). For SGLT1, we used  $\alpha$ -myc 1/300 (9E10 clone from Santa Cruz Biotech, CA) followed by HRP-linked goat anti-mouse 1/3000 (Jackson ImmunoResearch, PA). For EcaC, we used  $\alpha$ -CAT21-A 1/100 (Jackson ImmunoResearch, PA) followed by HRP-linked donkey anti-rabbit 1/10,000 (Jackson ImmunoResearch, PA). For PDI, we used  $\alpha$ -PDI 1/200 (Santa Cruz Biotech, CA) followed by HRP-linked donkey anti-rabbit 1/10,000 (Santa Cruz Biotech,CA). All incubations were performed in TBT-T with milk. Membranes were rinsed adequately between every step with TBS-T and revealed using enhanced chemiluminescence detection (Phototope-HRP, New England Biolabs, Pickering, ON, Canada).

### *Volume measurements*

Functionality of AQP2 was assessed by water flux measurements in non-injected and AQP2-injected oocytes. Briefly, the oocytes were placed in a 0.07 ml bath on the stage on an inverted, low power microscope equipped with a camera and a recording system for analysis of the oocyte cross section. The oocytes were challenged to a hyposmotic solution (-20mOsm), and osmotic-induced swelling monitored. The variation in volume were used to determined by water permeability values ( $P_f$ ) which are given in  $\mu\text{m/s}$ . For a more detailed description of this set-up and procedure, see Duquette *et al.* 2001 (9) and Charron *et al.* (4).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Technical considerations*

The need for an improved technique for the purification of plasma membrane of *X. laevis* oocytes came from the fact that all available techniques report various levels of contaminants originating from different intracellular stores (11, 13, 21), except that of Kamsteeg and Deen (14), which results in a high level of purification without any evidence of contaminants. Unfortunately, this technique requires a certain level of technical skill and turns out to be inappropriate when  $\pm 40$  oocytes are required for a given experiment.

The present technique was elaborated out of pre-existing techniques and essentially permits rapid and efficient purification of highly purified plasma membranes from *X. laevis* oocytes. The overall technique is accessible, does not require the manual removal of the vitelline membranes, and is accomplished in  $\pm 3$  h. The first step consists of the partial enzymatic digestion of the vitelline membrane with the use of subtilisin A. The purpose of this procedure is to make the vitelline membrane more permeable to the polymerizing agents applied thereafter. In contrast to techniques in which the vitelline membrane is physically removed with the use of microforceps, the partial digestion of this layer does not make the oocytes fragile and sticky, which greatly facilitates subsequent manipulations. In addition, the manual removal of this membrane is cumbersome and thus greatly limits the number of oocytes that can be treated by a single person. This treatment has been proposed to facilitate patch-clamp studies on oocytes (5). The enzymatic permeabilization of the vitelline membrane enables an efficient polymerization of the plasma membrane to the vitelline layer.

The use of polymerization as a strategy for the purification of oocyte plasma membranes was proposed by Chaney and Jacobson (2) and subsequently modified by Kamsteeg and Deen (14). This technique presents rapid and easy purification of

plasma membranes without the use of more fastidious techniques such as density-gradient centrifugation (13). Polymerized plasma membranes from the latter technique, although adequate, generate small membrane fragments that are difficult to separate from the remainder of the homogenate. On the other hand, when a similar purification is performed on oocytes in which the plasma membranes have been polymerized to the vitelline layer, large leaflets are generated that are easier to precipitate and also allow for their direct visualization through the successive centrifugation steps. The final pellet consists of highly purified plasma membranes attached to the vitelline fraction.

#### *Limitation of technique*

In a first set of experiments, we aimed at defining the limitations of this technique, delineating the number of oocytes that could be adequately processed in a given sample and also the ability to detect variations in expression levels in plasma membrane of the oocyte. For these purposes, we have chosen to express the AQP2 water channel since its detection in oocytes through Western blots is found to be quite sensitive. In Fig. 1, plasma membranes were purified from oocytes expressing AQP2 (1 ng cRNA per oocyte) in batches of 10–120 oocytes. As seen in Fig. 1, the specific signal found at 29 kDa gradually increases with the increasing number of oocytes used in the purification procedure. Although quite faint, AQP2 can be visualized even with as few as 10 oocytes, thus validating the technique from very low to high sample sizes. This flexibility in sample size makes it convenient to adapt for varying expression levels and Western blot sensitivity. Second, we also wanted to demonstrate the ability to visualize variations in expression levels of a given protein at the plasma membrane. In Fig. 2, plasma membranes were purified with the same sample size (40 oocytes per sample) expressing increasing levels of AQP2 (0–1 ng per oocyte) and visualized through Western blot. As seen in Fig. 2B, specific signals increasing in intensity are found in correlation with increasing activity levels for AQP2 (Fig. 2A) corresponding to injected cRNA. Identification

of possible contamination from intracellular stores, as determined by evaluation of PDI in the same blots, failed to show any specific contaminants (data not shown).

#### *Validation of technique*

In subsequent experiments, total membranes and purified plasma membrane fractions were tested for the presence of heterologously expressed proteins through Western blot analysis. For the sake of demonstrating the efficacy of the technique, it was applied to proteins normally targeted to the plasma membrane and to mutant forms known to be mistargeted or nonfunctional. Again, we have chosen AQP2 as a model to test this technique since the wild-type form of the protein (wt-AQP2) is strongly expressed at the plasma membrane while most mutant forms are known to be completely retained in intracellular stores. Also, we took advantage of one AQP2 mutant (D150E) that demonstrates predominant endoplasmic reticulum (ER) retention with low expression at the plasma membrane, thus displaying partial targeting. In Fig. 3A, we present water permeabilities of control and AQP2-injected oocytes. As shown in Fig. 3A, oocytes injected with 1 ng of wt-AQP2 cRNA display a net increase in water permeability ( $93 \pm 22 \mu\text{m/s}$ ) while G196D-AQP2-injected oocytes (10 ng) display water permeabilities similar to controls ( $3.6 \pm 1.5$  and  $4.4 \pm 1.4 \mu\text{m/s}$ , respectively). The oocytes injected with D150E-AQP2 (10 ng) exhibit intermediary water permeability ( $24.8 \pm 6.5 \mu\text{m/s}$ ), consistent with its partial targeting at the plasma membrane. Figure 3B presents Western blot detection of AQP2 in control and AQP2-injected oocytes on both total membranes and purified plasma membrane fractions prepared following the technique described above. As seen in the total membrane lanes, the AQP2 protein is adequately synthesized in both wild type (29-kDa band) and mutants (29- and 31-kDa bands). On the other hand, the signal found in the purified plasma membrane lanes is a clear reflection of the membrane activity found in Fig. 3A. While a strong signal is found in wild-type protein, a fainter signal is seen with D150E-AQP2 and no signal is found for the nonfunctional G196D-AQP2 mutant. It should be noted that only the mature band of D150E-AQP2 (29 kDa) is found in the purified



plasma membrane fraction, as for wt-AQP2. Once again, PDI was used as marker for intracellular contaminants. Even in overexposed blots, no trace of PDI could be seen in purified plasma membrane fractions.

To further substantiate the efficacy of this technique, we have performed similar studies on two other proteins: the Na<sub>+</sub>-glucose cotransporter SGLT1 and the TRPV5 Ca<sub>2+</sub>-selective channel, testing both wild-type proteins and mutants for which a lack of function has been established. SGLT1 has been extensively studied in *X. laevis* oocytes. Functional studies as well as immunofluorescence labeling have shown adequate targeting to the plasma membrane (1). In Western blots, both mature (glycosylated) and immature forms of the protein are found (18). In Fig. 4, we compare Western blots for SGLT1 of total membrane and purified plasma membranes for both wild type and mutants (C351A and C361A). Both of these mutants have been previously reported to be nonfunctional in oocytes, but even though mistargeting was suspected their actual processing has not been determined (10). The Western blot of total membranes confirms that both mutant SGLT1 proteins are being synthesized, although the mature glycosylated form is lacking, which is found with the wild-type form of the protein (69- and 61-kDa forms, also see Ref. 18). In purified plasma membranes, only the mature form of the wild-type protein is found. Immature forms of the protein, be it of the wild type or the mutated proteins, are not evidenced. It thus seems that both mutants of SGLT1 are sequestered in intracellular stores, most probably the ER. In Fig. 4, *bottom*, evaluation of PDI indicates that no intracellular contaminants are found in the purified plasma membrane fractions. The TRPV5 is also well expressed in *X. laevis* oocytes (3, 8). The protein is adequately targeted at the plasma membrane and exhibits normal functionality. In Western blots from oocytes, TRPV5 is expressed as a doublet that represents glycosylation variants (79 and 88 kDa; also see Ref. 3). We have expressed in oocytes the wild-type form as well as two non-functional mutants (N518C and F531C) of TRPV5 (8) and assessed their plasma membrane targeting with Western blots. As shown in Fig. 5, in total membrane samples all three forms of TRPV5 are well expressed, essentially as unglycosylated forms,

although glycosylated variants are present for all three proteins. On the other hand, in purified plasma membranes only the wild-type protein is detected, with the mature glycosylated form being predominant. In contrast, the dominant form of the wild-type TRPV5 in the total membrane preparation resides in the lower molecular-mass form (79 kDa). It may thus be assumed that the lack of function of the two TRPV5 mutants originates from entrapment of the proteins in intracellular stores. Once again, as shown in Fig. 5, *bottom*, evaluation of PDI shows the absence of intracellular contaminants in the purified plasma membrane fractions.

In conclusion, we have elaborated a technique that permits rapid and efficient purification of plasma membranes from *X. laevis* oocytes that combines partial digestion of the vitelline layer with polymerization of the plasma membrane. High-level purification is thus achieved without fastidious technical steps, such as manual vitelline removal or centrifugation on density gradients. This improved technique provides a new means of investigation for the study of plasma membrane protein targeting, a key feature of both physiological and pathological interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), grant # MOP-10580, Chair in Genetics of Renal Disease (DGB) and by the FRSQ infrastructure program # 5252.

#### REFERENCES

1. **Bissonnette P, Noel J, Coady MJ, and Lapointe JY.** Functional expression of tagged human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2: 359-371, 1999.
2. **Chaney LK and Jacobson BS.** Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins. *J Biol Chem* 258: 10062-10072, 1983.

3. **Chang Q, Gyftogianni E, van de Graaf SF, Hoefs S, Weidema FA, Bindels RJ, and Hoenderop JG.** Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J Biol Chem* 279: 54304-54311, 2004.
4. **Charron FM, Blanchard MG, and Lapointe JY.** Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *Biophys J*, 2006.
5. **Choe H and Sackin H.** Improved preparation of *Xenopus* oocytes for patchclamp recording. *Pflugers Arch* 433: 648-652, 1997.
6. **Cucu D, Simaels J, Jans D, and Van Driessche W.** The transoocyte voltage clamp: a non-invasive technique for electrophysiological experiments with *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 447: 934-942, 2004.
7. **Deen PM, Croes H, van Aubel RA, Ginsel LA, and van Os CH.** Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 95: 2291-2296, 1995.
8. **Dodier Y, Banderali U, Klein H, Topalak O, Dafi O, Simoes M, Bernatchez G, Sauve R, and Parent L.** Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis. *J Biol Chem* 279: 6853-6862, 2004.
9. **Duquette PP, Bissonnette P, and Lapointe JY.** Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801, 2001.
10. **Gagnon DG, Bissonnette P, and Lapointe JY.** Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 127: 145-158, 2006.
11. **Geering K, Theulaz I, Verrey F, Hauptle MT, and Rossier BC.** A role for the beta-subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 257: C851-858, 1989.
12. **Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, and Wright EM.** Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature* 330: 379-381, 1987.
13. **Hill WG, Southern NM, MacIver B, Potter E, Apodaca G, Smith CP, and Zeidel ML.** Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma

membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F217-224, 2005.

14. **Kamsteeg EJ and Deen PM.** Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 683-690, 2001.

15. **Li HC, Szligeti P, Worrell RT, Matthews JB, Conforti L, and Soleimani M.** Missense mutations in Na<sup>+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBC1 show abnormal trafficking in polarized kidney cells: a basis of proximal renal tubular acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F61-71, 2005.

16. **Nakamura F, Goshima Y, Strittmatter SM, and Kawamoto S.** Isolation of receptor clones by expression screening in *Xenopus* oocytes. *Methods Mol Biol* 128: 1- 18, 1999.

17. **Sigel E and Minier F.** The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49: 228-234, 2005.

18. **Turk E, Kerner CJ, Lostao MP, and Wright EM.** Membrane topology of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *J Biol Chem* 271: 1925-1934, 1996.

19. **Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, and Broer S.** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10: 1-12, 2000.

20. **Waldegger S, Busch AE, Kern C, Capasso G, Murer H, and Lang F.** Function and dysfunction of renal transport molecules: lessons from electrophysiology. *Kidney Blood Press Res* 19: 155-159, 1996.

21. **Wall DA and Patel S.** Isolation of plasma membrane complexes from *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 107: 189-201, 1989.

## LEGENDS

FIGURE 1: *detection according to sample size*: Oocytes were injected with 1 ng cRNA coding for wild type AQP2 and processed as described in Methods to purify plasma membranes using increasing amounts of oocytes (10 to 120). Samples were loaded on gel and AQP2 detected using Western blot procedure.

FIGURE 2: *detection according to expression level*: Oocytes were injected with increasing amounts of cRNA (0 to 4.6 ng) coding for wild type AQP2 and tested for both activity and Western blot detection. A- Evaluation of water permeability ( $P_f$ ) as described in Methods. B- Western blot of plasma membranes (40 per conditions) purified from same oocytes tested in A showing a direct correlation between AQP2 activity and protein expression at the plasma membrane.

FIGURE 3: *Western blot of total membranes and purified plasma membranes from AQP2-injected oocytes*. Oocytes were injected with wild type (1 ng) or mutant (D150E and G196D, 10 ng) AQP2 and tested for both activity and Western blot. Functionality was assessed by water permeability analysis (Panel A) for controls ( $P_f = 3.6 \pm 1.5 \mu\text{m/s}$ ), wild type ( $P_f = 93 \pm 22 \mu\text{m/s}$ ), D150E ( $P_f = 25 \pm 6.5 \mu\text{m/s}$ ) and G196D ( $P_f = 4.4 \pm 1.4 \mu\text{m/s}$ ) AQP2's. Panel B shows a Western blot performed on total membranes (5 oocytes) and purified plasma membranes (40 oocytes) from same samples. In total membranes, mature AQP2 is shown at 29 kDaa while high-mannose form is seen at 31 kDaa for both mutants. In purified plasma membrane, only the mature form of the protein is found. Note the strong signal for wild type compared to the fainter D150E. G196D is not detected in this purified fraction. PDI, an ER marker, was used to show the absence of this major contaminant in the purified membrane fraction.

FIGURE 4: *Western blot of total membranes and purified plasma membranes from SGLT1-injected oocytes.* Total membranes (5 oocytes) and purified plasma membranes (40 oocytes) from oocytes injected with 46 ng wild type or mutant (C356A and C361A) SGLT1, along controls, were tested in Western blot. As shown in total membranes, products are generated for all SGLT1 variants, although the mature protein (69 kDaa) is only found in wild type. The two mutants only display low molecular weight products. In purified plasma membranes, only the mature SGLT1 protein is detected in the wild type while immature forms are never found. In lower panel, detection of PDI (ER marker) indicates the absence of contamination in purified membrane fractions.

FIGURE 5: *Western blot of total membranes and purified plasma membranes from TRPV5-injected oocytes.* Total membranes (5 oocytes) and purified plasma membranes (40 oocytes) from oocytes injected with 46 ng wild type or mutant (N518C and F531C) TRPV5, along controls, were tested in Western blot. As shown in total membranes, products are generated for all TRPV5 variants, showing essentially low molecular weight forms with mature glycosylated forms. In purified plasma membrane fractions, only wild type proteins are detected, with glycosylated forms being predominant this time. PDI detection in lower panel indicates the absence of contamination in purified membrane fractions.

FIGURE 1

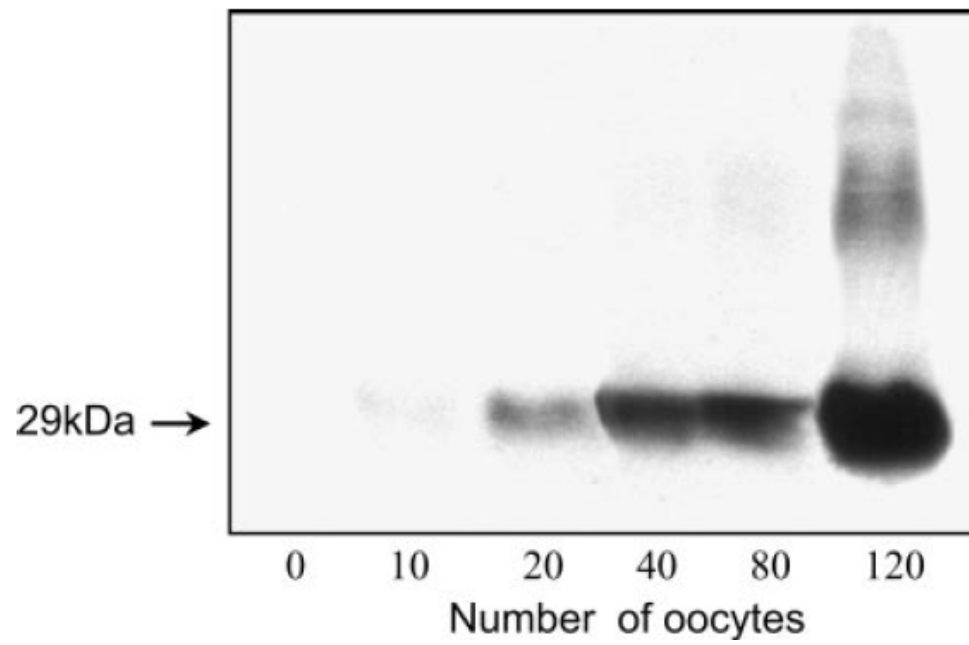


FIGURE 2

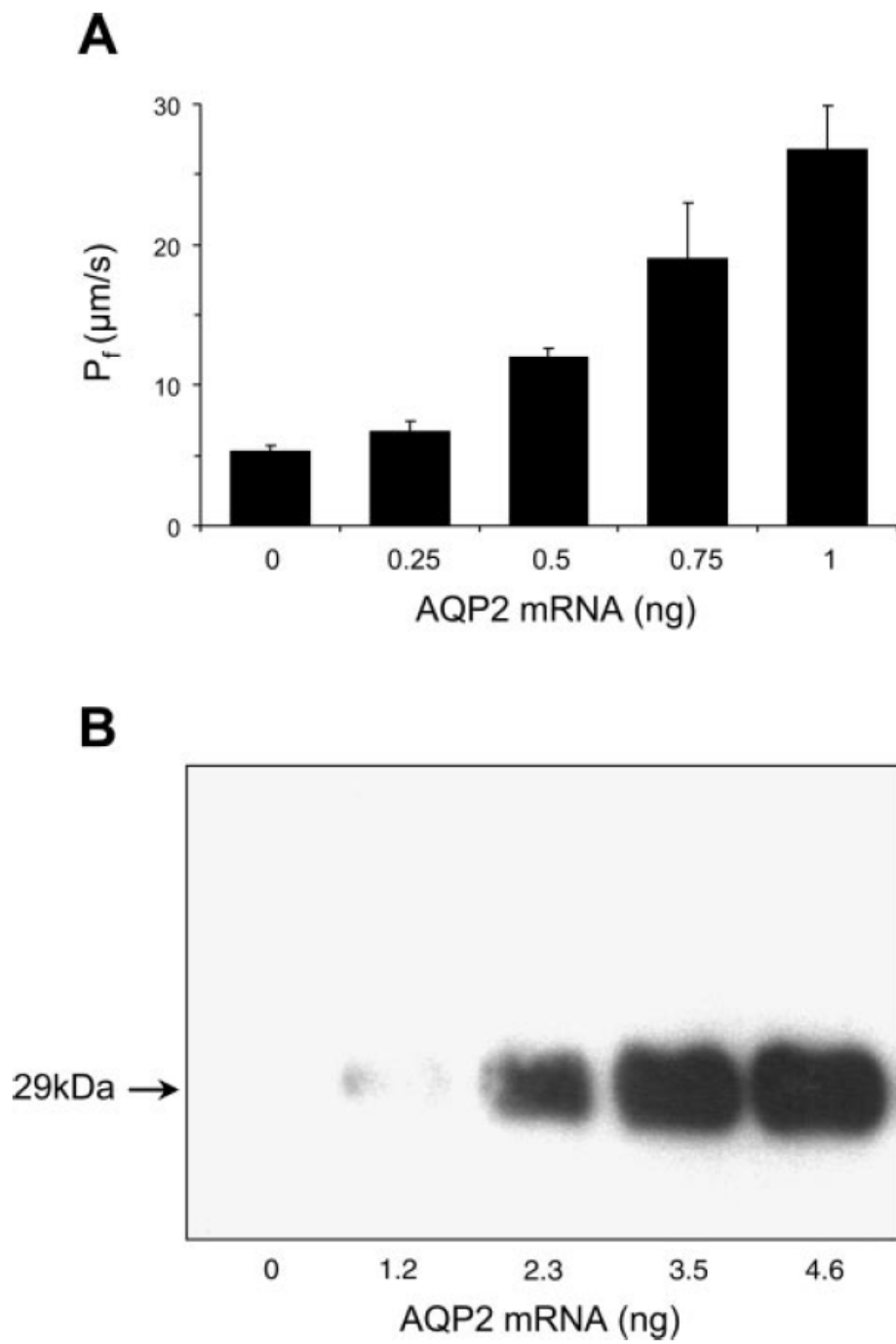




FIGURE 3

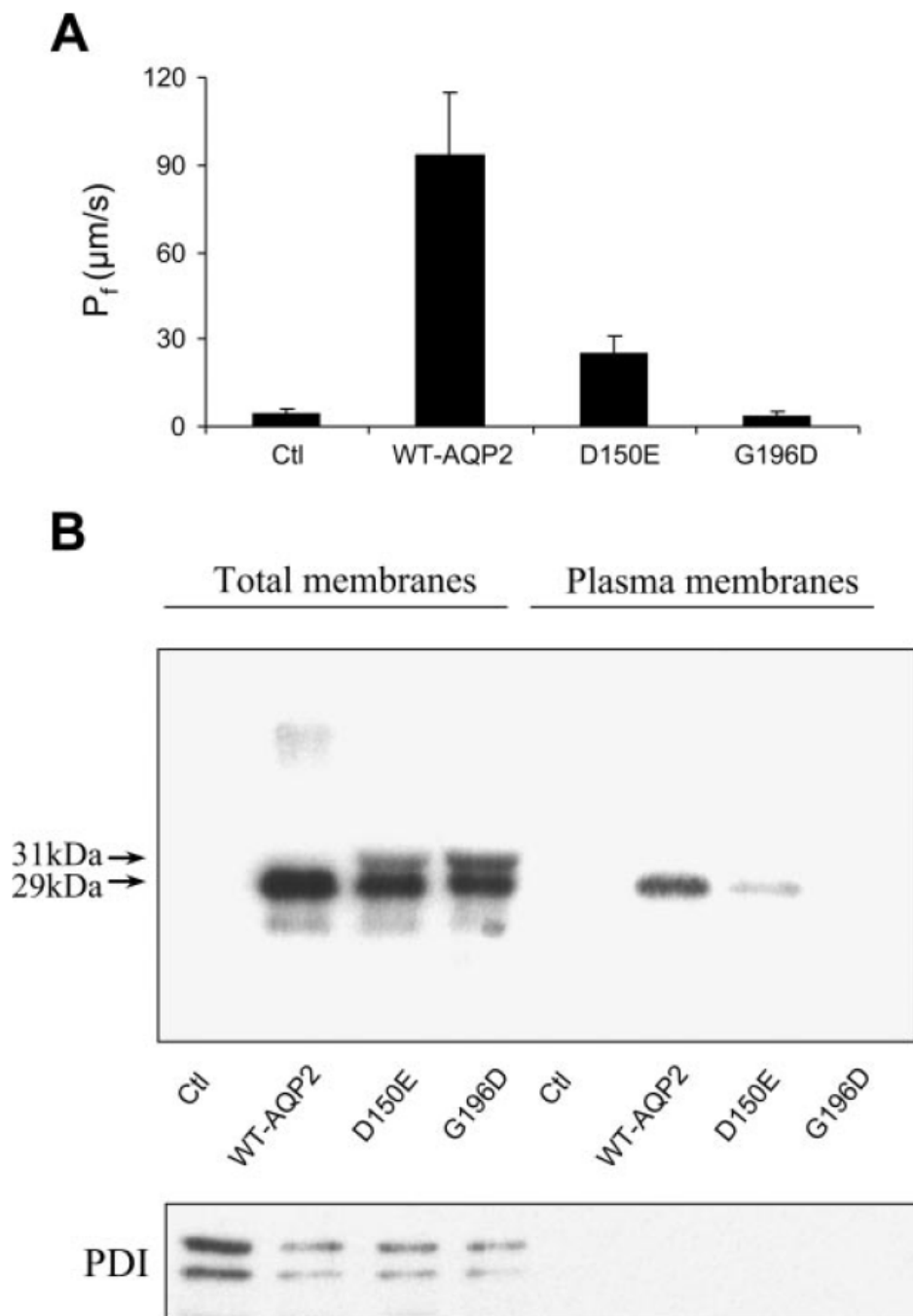


FIGURE 4

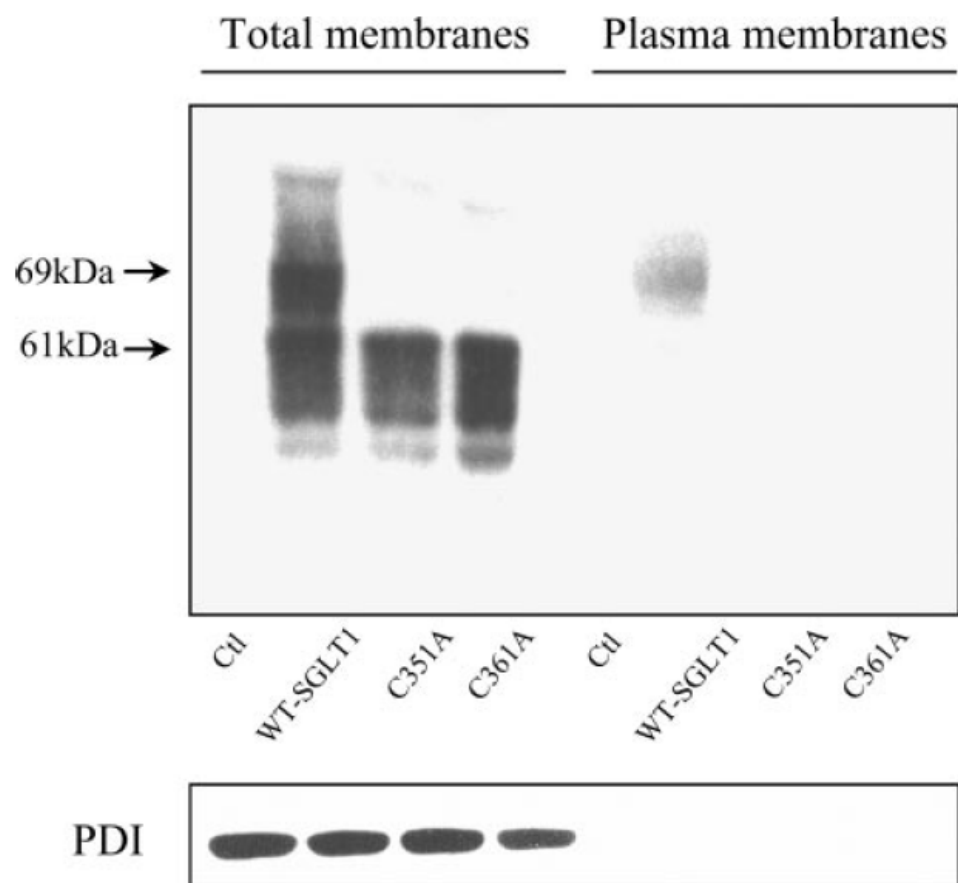
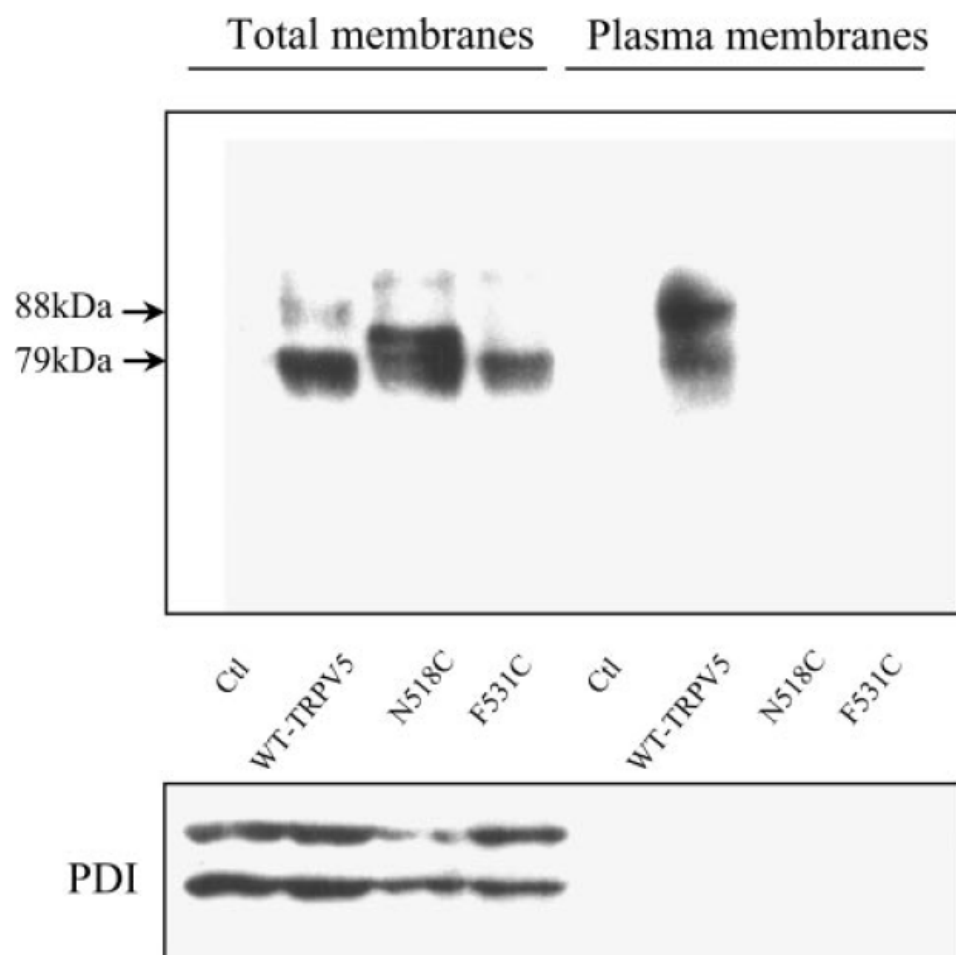


FIGURE 5



**2.2 « Autosomal recessive mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with apparent normal expression in *Xenopus* oocytes. »**

Alexandre LEDUC-NADEAU<sup>1</sup>, Yoann LUSSIER<sup>1</sup>, Pierre BISSONNETTE<sup>1</sup>  
and Daniel G. BICHET<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), département de Physiologie, Université de Montréal, and <sup>2</sup>Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running Title: Functional analysis of two new recessive AQP2 mutations implicated in nephrogenic diabetes insipidus.

État de l'article : en préparation pour soumission imminente.

Contribution des auteurs : Toutes les figures présentées dans l'article proviennent du travail de laboratoire du premier auteur, excepté pour la figure 4 qui provient de l'excellent travail du Dr Bissonnette et de M. Lussier. De plus, le Dr Bissonnette a eu un rôle important dans l'élaboration de l'article et a offert un soutien technique important. Les mutations étudiées proviennent de cas de patients du Dr Bichet qui a aussi fourni un immense soutien à l'élaboration de cet article.

## ABSTRACT

Aquaporin-2 (AQP2), located at the luminal side of the collecting duct principal cells, is a water channel responsible for the final concentration of urine. Lack of function, often occurring through mistargeting of mutated proteins, induces nephrogenic diabetes insipidus (NDI), a condition characterized by large urinary volumes. In the present study, two new mutations (K228E and V24A) identified in NDI affected individuals from distinct families along the already reported R187C were analyzed in comparison to the wild-type protein (AQP2-wt) using *Xenopus Laevis* oocytes and mIMCD-3 cells. Initial data show that all mutations are adequately expressed at moderate levels when compared to AQP2-wt. In oocytes, K228E and V24A were found to be efficiently targeted at the plasma membrane, as opposed to R187C which was retained in internal stores. Also, both K228E and V24A exhibited adequate functionality in comparison to AQP2-wt. When expressed in mIMCD-3 cells, forskolin treatment efficiently promoted the targeting of AQP2-wt at the plasma membrane (>90%) while K228E weakly responded to same treatment ( $\approx 20\%$ ) and both V22A and R187C remained completely insensitive to the treatment. In coexpression studies, R187C impeded the functionality of all other AQP2 variants while combinations within K228E, V24A and AQP2-wt only showed additive functionalities. We concluded that both V24A and K228E are functional water channels and that NDI found in both compound mutations studied (K228E + R187C and V24A + R187C) were essentially a consequence of mistargeting. The discrepancies in plasma membrane targeting properties found in both expression systems stress the need to confirm such data using mammalian cell systems.

## INTRODUCTION

Aquaporin-2 (AQP2) is a water channel of homotetrameric structure that is specifically expressed in principal cells of the kidney collecting duct. Initially located in intracellular vesicles, AQP2s are shuttled and fused with the luminal membrane in response to basolateral signaling from vasopressin, thus opening water permeability and allowing water reabsorption from urinary filtrate. As the final water reabsorption step, AQP2's function is paramount to body water homeostasis. Lack of function, as found in individuals bearing mutations in AQP2, induces nephrogenic diabetes insipidus (NDI), a condition where normal water reabsorption is impeded. Affected individuals are unable to concentrate ultrafiltrate, thus producing large urinary volumes. As numerous mutations have now been reported in the literature, and analyzed through diverse expressing systems, some fundamental mechanistic aspects of the disease have now been deciphered. Most AQP2-related NDI are found to be recessive hereditary traits (20). Consequently, heterozygotes bearing one defective allele are often non symptomatic as two defective alleles are required to induce NDI. Frequently, mistargeting of altered AQP2 protein is responsible for the absence of function (3, 15, 16). The mutated proteins, believed to be misfolded, are usually retained in intracellular stores (ER), and eventually routed for degradation (class II mutations) (20). In some cases these mutated forms of AQP2 are shown to be functional although usually with lesser efficacy (16, 18). Sometimes NDI may also be expressed as a dominant trait (20). These are found to be restricted to mutations in the C-terminal end of the AQP2 protein and usually operate through a dominant negative effect. In this mode of action, the altered protein associates and retains functional AQP2 counterparts within intracellular stores thus preventing normal apical targeting and function (12, 19). Past studies using the *Xenopus laevis* oocyte expressing system, has been very useful in defining pathophysiological aspect of AQP2 enabling both functional and biochemical analysis of the protein (3, 18). Water flux

measurements are readily accessible through volume estimations of oocytes challenged with osmotic gradient and most biochemical features including protein synthesis, post-translational modification and targeting can easily be studied on such large cells. Also, the oocyte allows for highly controlled coexpression studies (10) which permit to unveil possible multimeric associations within AQP2 variants (mutants) that may be responsible for dominant negative effect suspected in some AQP2 mutations. Other expressing systems such as yeast (21) and mammalian cell lines (8, 14, 16) have also been used with success, and normally confirm data determined in oocytes. In this study, we present the analysis of two new mutations (K228E and V24A) identified in two distinct families along the already reported R187C. In the first family, two individuals are affected, while in the second family, only one individual is affected, however both being compound mutations (K228E + R187C and V24A + R187C) while all heterozygotes have no symptoms. Using the *X. laevis* oocytes expressing system, we present both functionality analysis and biochemical characterization for each mutation, probing both pure and coexpression conditions. Furthermore, forskolin treatment on mIMCD-3 cells allowed the study of the targeting of the mutations.

## MATERIAL AND METHODS

### *Oocyte preparation, injection and maintenance*

Ovary nodes were surgically removed from gravid *Xenopus laevis* frogs and oocytes (stage V-VI) were isolated by hand. Follicular layers were removed using a collagenase treatment (17.5 mg/ml, Type 1A, Sigma-Aldrich) for 1 hour under mild agitation in a  $\text{Ca}^{++}$  free Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgSO}_4$ , and 5 HEPES pH 7.6) followed by overnight incubation at 18°C in normal Barth's solution (same as above with 0.4 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) supplemented with horse serum (5%), sodium pyruvate (2.5 mM) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin and 0.1mg/ml kanamycin). The oocytes were then injected with AQP2 cRNAs in varying (figure 2) or fixed quantities for wild-type (1ng), mutated (10ng) or a combination of both (as specified in figure legends) and further incubated for 1 to 3 days before proceeding to experimentation. cRNA preparations were diluted in water and injected with 46 nl per oocyte using a microinjection apparatus (Drummond Scientific, Broomall, PA).

### *Vectors and cRNA*

All constructs used for expression in oocytes were elaborated using the pT7Ts vector. The three point mutations, K228E, V24A and R187C, were inserted using sitedirected mutagenesis within the wild-type AQP2 vector (pT7Ts-AQP2-wt) and validity of constructs was confirmed through sequencing. Primers used were CCGCCAGCCGAGAGCCTGTC (forward) and GACAGGCTCTCGGCTGGCGG (reverse) for K228E, CTCCTCTTCGCCTTCTTTGGC (forward) and GCCAAAGAAGGCGAAGAGGAG (reverse) for V24A and AATCCTGCCTGCTCCCTGGC (forward) and



GCCAGGGAGCAGGCAGGATT (reverse) for R187C. Hemagglutinin (HA) and His tags were added to pT7Ts-AQP2-wt at the N-terminal position using SpeI and BglII restriction site. For preparation of cRNAs, all vectors were linearized with SalI and cRNAs synthesized using the mMessage mMachine T7 kit (Ambion, Austin, TX). pcDNA6-AQP2-wt vector used for expression in mIMCD-3 cells was generated by subcloning the full length AQP2 from pT7TS-AQP2-wt using BamHI and XbaI unique sites and all three mutations were inserted in pcDNA6-AQP2-wt using the same strategy as described above for pT7Ts- AQP2-wt.

#### *Cell culture maintenance and Transfection*

mIMCD-3 cells were routinely cultured in DMEM-F12 media supplemented with 10 % FBS and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and maintained in a 95% air 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For transfection with pcDNA6-AQP2 variants, cells were seeded on coverslips and transfection performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) on 90% confluent monolayers (8µg / 60mm Petri dish). After 16-24 hours incubation, coverslips were treated or not with forskolin (50µM, 45 min.) and fixed at -20°C for 20 minutes with formaldehyde (1%) diluted in methanol.

#### *Preparation of total and plasma membrane fractions of oocytes*

For descriptive methodology, see (13). Briefly, total membranes were prepared by homogenizing 10 oocytes in 1 ml homogenizing buffer (HbA, in mM: 5 MgCl<sub>2</sub>, 5NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 EDTA, 80 sucrose, and 20 Tris pH 7.4) followed by a low (250 x g for 10 min.) and high (16,000 x g for 20 min.) speed centrifugations. Pellets were resuspended in 20 µl HbA (2 µl solution / oocyte) and frozen until use. For plasma membranes, 40 oocytes were treated for 10 minutes at room temperature with 0.005% subtilisin A (Sigma-Aldrich)

followed by two 1 hour polymerizing steps (1% ludox, then with 0.1% polyacrylic acid; Sigma-Aldrich) performed at 4°C. The oocytes were then homogenised in cold HbA (in mM: 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 EDTA, 80 sucrose and 20 Tris pH 7.4) by hand with a P200 pipettor followed by successive low speed centrifugations (16, 16, 25 and 35 x g, all for 30 sec at 4°C) keeping the bottom 75µl and replacing the supernatant with equivalent volumes of fresh HbA. A final centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes pellets the purified plasma membranes which were resuspended in 10ul HbA and frozen until use.

### *Western blots*

Western blots were performed as described previously (1) using total membranes and purified plasma membranes as described above. Samples representing either 2 oocytes (total membranes) or 40 oocytes (purified plasma membranes) were run on a 12% gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T (TBS + Tween 20, 0.1%) and probed with specific antibody ( $\alpha$ -AQP2 1/100; N-20 from Santa Cruz Biotech, CA) followed by HRP-linked chicken anti-goat 1/25,000 (Santa Cruz Biotech,CA). For specific determination of AQP2-wt in coexpression studies using HA-AQP2-wt, blots were probed using HRP-linked mouse anti-HA antibody (1/500 dilution, Roche, Laval, QC). Validation of plasma membrane purification was performed by probing Westerns for protein disulphide isomerase (PDI), an endoplasmic reticulum resident enzyme ( $\alpha$ -PDI 1/500 followed by HRP-linked donkey anti-rabbit 1/10,000; Santa Cruz Biotech,CA). All incubations were performed in TBS-T + 5% non-fat milk and membranes were revealed using enhanced chemiluminescence detection (Phototope-HRP, New England Biolabs, Pickering, ON, Canada).

### *Immunofluorescence*

On oocytes: Immunofluorescence detection on oocytes was performed according to protocol described earlier for fixed oocytes (1). Control, wild-type (1 ng) and mutant (10 ng) injected-oocytes were incubated for 72 hours before immunofluorescence assay. Oocytes were rinsed 3 times with Barth's solution and fixed for 15 minutes in ice-cold methanol solution containing 1% formaldehyde. Fixed oocytes were rinsed again three times and incubated overnight in a 30% sucrose solution in Barth's solution. Oocytes were embedded in Tissue-tek embedding medium diluted 1/7 in water (Sakura Finetek, USA), frozen, sliced (10  $\mu$ m thickness) on cryostat and mounted on slides. Slices were blocked for 30 minutes at room temperature with 2% BSA solution in PBS to prevent non-specific binding of antibody. Incubation with anti-AQP2 antibody at a dilution of 1:20 in PBS + BSA was performed in a wet chamber at room temperature for one hour, and then rinsed three times in PBS. Incubation with secondary antibody (Alexa Fluor 488 conjugated anti-goat antibody, 1:1000 in blocking solution, Molecular Probes, Eugene, OR) was performed as for the first antibody and rinsed accordingly. Slides were mounted using an anti-quenching agent (Prolong antifade, Molecular Probes, Eugene OR) prior to observation.

On cells: Immunofluorescence on cell monolayers was performed using confluent mIMCD-3 cells grown and transfected on coverslips as described earlier (1). AQP2 proteins (green) were visualized using the same protocol as for oocytes. Prior to fixation, coverslips were treated or not with forskolin (50 $\mu$ M, 45 min. (2)) in order to evaluate cAMP-dependent plasma membrane insertion of all AQP2 variants. Protein disulfide isomerase (PDI) was used as ER marker and visualized (red) using specific antibody (mouse  $\alpha$ -PDI, 1/50 dilution, Santa Cruz Biotech., CA) along corresponding secondary antibody (alexa 568-labeled  $\alpha$ -mouse, 1/1000 dilution, Molecular probes, Eugene, OR).

Nuclei were stained by incubating slides in DAPI for 30 minutes (Sigma, 1 $\mu$ g/ml in PBS). As for oocytes, slides were mounted using an anti-quenching agent (Prolong antifade, Molecular Probes, Eugene OR) prior visualization (60 X) and micrograph treatments were performed using Olympus IX-81 microscope along Image-Pro Plus v.5.0 software.

#### *Volume measurements*

Functionality of AQP2 was assessed by water flux measurements in non-injected and AQP2-injected oocytes. Briefly, the oocytes were placed in a 0.07 ml bath on the stage on an inverted, low power microscope equipped with a camera and a recording system for analysis of the oocyte cross section. The oocytes were challenged to a mild hypo-osmotic solution (-20mOsm), and osmotically induced swelling monitored. The variations in volume were used to determine water permeability values (Pf) which are given in 10<sup>-4</sup> cm/s. More detailed descriptions of this set-up and procedure are presented elsewhere (5).

#### *Data analysis*

All experiments were performed at least three times using different oocyte batches and values are presented as mean  $\pm$  S.D. Oneway ANOVA + Tukey statistical analysis was performed on all Pf determinations. Molecular weights and densitometry analyses were evaluated using software from alpha-imager 2000 (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA).

## RESULTS

### *Family description*

This report presents two new mutations for AQP2, K228E and V24A respectively identified in individuals from family 1 and 2 (figure 1), along the already described mutation R187C identified herein in both families. Also in both families, only the compound heterozygote individuals presenting both mutations (K228E + R187C in family 1 and V24A + R187C in family 2) are affected with severe NDI while other individuals bearing only one mutation (heterozygotes) are all healthy.

### *Expression of mutated AQP2 in oocytes:*

Since mutated forms of AQP2 are often ill-expressed in oocytes, the relative translational efficiencies of all three AQP2 mutations along wild-type were initially evaluated through densitometry analysis of Western blots. All AQP2 variants were thus expressed using increasing amounts of cRNA (0.5 to 2 ng for AQP2-wt and 1 to 5 ng for mutant forms) and densitometry values plotted against ng cRNA. The figure 2A presents a typical western blot with increasing AQP2 labeling and the mean densitometry values from 5 individual experiments were used to evaluate their relative expression efficiencies. As seen in Figure 2B, the wild-type form of AQP2 expresses more efficiently so that 1 or 2 ng of AQP2-wt cRNA globally compares to 5 ng cRNA of any mutant. A ratio of 1 to 5 was thus chosen in coexpression studies to evaluate interactions between wild-type and mutant forms of AQP2. In the following set of experiments, all three mutants were compared to AQP2-wt looking at both functionality (Figure 3A) and plasma membrane targeting (Figure 3C-D). For this analysis, oocytes were injected with either 1ng AQP2- wt cRNA or 5ng cRNA coding for each mutation. As seen in panel B, where total AQP2 proteins

are evaluated (total membrane preparations), all three mutations were adequately expressed in oocytes, alike AQP2-wt. The expression levels were also found to be equivalent for all AQP2 variants tested thus validating the 1 to 5 cRNA ratio already determined above in Figure 2. The Western blot profile found for the wild-type protein essentially depicts a major 29kDa band along a very faint band at 31kDa while all mutations tested displayed a more prominent 31kDa band in addition to the 29kDa band. In all assays performed on mutants, the 29kDa band was always found to be predominant with the exception of R187C which usually display equivalent 29- and 31kDa bands. When purified plasma membranes from the same oocytes were probed for AQP2 (panel C), all variants except R187C were found to be adequately targeted at the plasma membrane. It is also noteworthy that the 31kDa bands are absent from the plasma membrane fractions. The absence of ER-resident protein disulfide isomerase (PDI) staining in the lower blot of panel C, as opposed to panel B, demonstrates the absence of intracellular membrane contaminants in the purified plasma membrane fractions tested, thus validating the purification procedure (13). Similarly, immunofluorescence labelling of AQP2 performed on oocyte slices (panel D) also demonstrated the plasma membrane localization for all AQP2 variants under study with the exception of R187C which is retained in intracellular stores, most probably the ER. These plasma membrane targeting results also correlate with functionality assays (panel A) as all variants adequately targeted (AQP2-wt, V24A and K228E) also display appropriate water permeability values (in this experiment, Pf values are  $14.4 \pm 5.5$ ,  $16.3 \pm 3.5$  and  $19.9 \pm 7.0 \times 10^{-4}$  cm/s, respectively). As expected, the single mistargeted mutant, R187C, displayed no specific activity ( $Pf = 2.6 \pm 0.6 \times 10^{-4}$  cm/s) similar to water-injected oocytes ( $Pf = 2.8 \pm 1.0 \times 10^{-4}$  cm/s). Overall statistical analysis of functionality for all AQP2 variants (7 independent assays) comparing expressions of 1 ng wild-type against 5 ng for mutant forms gave Pf values of  $14.2 \pm 4.5 \times 10^{-4}$  cm/s for AQP2-wt ( $n = 64$ ),  $16.0 \pm 5.5 \times 10^{-4}$  cm/s for

V24A (n = 24),  $22.2 \pm 5.2 \cdot 10^{-4}$  cm/s for K228E (n = 24), and  $2.4 \pm 0.7 \cdot 10^{-4}$  cm/s for R187C (n = 24) which is similar to controls ( $2.8 \pm 1.1 \cdot 10^{-4}$  cm/s, n = 64).

Studies were also performed to determine the relative plasma membrane targeting efficacy for all AQP2 species under study. To do so, Western blots from both total and plasma membranes samples were probed for AQP2 and relative densities for each mutant were evaluated and compared to AQP2-wt which served as reference, i.e. total over plasma membrane densities ratio for AQP2-wt = 1. Results averaging 5 assays indicated that V24A (5ng) has a similar plasma membrane targeting efficacy (ratio of 1.2) in comparison to AQP2-wt (1ng) while K228E (5ng) reaches the plasma membrane slightly more efficiently (ratio of 1.7). Furthermore, relative single channel activity levels were assessed by comparing Western blot densitometry values of each AQP2 variants, as found at the plasma membrane, against their respective activity levels (Pf values). Once again taking AQP2- wt as reference (Pf over density = 1), both V24A (ratio = 1.2) and K228E (ratio = 1.2) displayed single channel functionalities similar to AQP2-wt.

To confirm data obtained in oocytes, targeting studies were also performed using the renal mIMCD-3 cell line. To do so, cells transfected with all three mutant AQP2 forms were compared to AQP2-wt for their ability to reach the plasma membrane following forskolin treatment. As seen in the top panel of Figure 4, AQP2-wt responds adequately showing clear plasma membrane localization of the protein after forskolin treatment (arrow) in over 90 % of the expressing cells (n >50) while R187C remains within intracellular stores despite same treatment (n >30). These two results are in agreement to those previously found in oocytes. For the two remaining mutants, the plasma membrane labeling found is either weak (20% for K228E, n >50) or completely absent (V24A, n >30).

*Coexpression studies:*

As mentioned above, only the two compound mutations individuals (K228E + R187C in family 1 and V24A + R187C in family 2) are affected. In that context, a study was performed where oocytes were injected with AQP2 variants in accordance to the reported family genotypes presented in Figure 1. The goal of this study was to correlate functionality results, as determined by water permeability evaluations, with their respective plasma membrane expression levels, as determined by Western blot. Oocytes were thus injected either with pure AQP2 variants or with a mixture of cRNA to allow an equivalent coexpression of AQP2 products (1ng HA tagged AQP2-wt + 5ng mutant cRNAs or 5ng of each mutant). The functionality results presented in Figure 5A and B are mean  $\pm$  S.D. (in % of AQP2-wt) of 22 to 30 determinations per condition collected within 6 separate experiments. As seen in the panel A representing family 1, K228E (10ng) displayed a functionality superior to that of the wild-type (1ng) ( $162 \pm 37$  %) while R187C (10ng) was without activity, similar to water-injected oocytes ( $22 \pm 9$  and  $22 \pm 13$  %, respectively). Coinjecting mutant forms along AQP2-wt either increased (+ K228E,  $169 \pm 58$  %) or partially inhibited (+ R187C,  $52 \pm 24$  %) the level of activity in comparison to AQP2-wt alone. Lastly, coinjecting K228E along R187C also generated intermediate activity levels ( $107 \pm 45$  %). Asterisks indicate statistical difference from pure AQP2-wt ( $p < 0.05$ ). In addition, Western blots were also performed to evaluate the impact of the diverse expressing conditions on the presence of both total and wild-type forms of AQP2 at the plasma membrane. For that purpose, an HA-tagged version of AQP2-wt was used to allow its discrimination against mutant forms of the protein within a same sample. Care was taken to confirm that the presence of the HA-tag at C-terminus did not impede the normal functionality of the protein (data not shown). Western blots were thus performed on purified plasma membranes using either an anti-AQP2 antibody to evaluate total AQP2 (upper



blot) or an anti-HA antibody to specifically evaluate the wild-type form of AQP2 (lower blot). As seen in the blots presented in Figure 5A, all AQP2-injected oocytes with the exception of R187C displayed appropriate staining at plasma membranes, which correspond to the functionality data shown in the above graph. The lower blot specifically presenting HA-AQP2-wt indicates that the wild-type protein was present in plasma membranes of in all conditions, including when coexpressed along K228E or R187C. The higher molecular weight found with HA-AQP2-wt ( $\approx 2$  kDa) is due to the addition of the HA-tag.

For the second family case study (Figure 5B), similar results were found; functionality of V24A was equivalent to AQP2-wt ( $109 \pm 29$  %) while R187C was completely inactive, similar to control oocytes ( $15 \pm 5$  and  $14 \pm 5$  %, respectively). Also, coinjecting AQP2-wt is additive with V24A ( $136 \pm 26$  %) and inhibitory with R187C ( $36 \pm 17$  %), as when both mutations are coinjected together ( $43 \pm 24$  %). Once again, the corresponding Western blot presents AQP2 labeling at the plasma membrane that are compatible with activity i.e. adequate labeling for AQP2-wt and V24A but not R187C (upper blot). Again, the presence of AQP2-wt at the plasma membrane, as detected using anti-HA antibody (lower blot), was found even when coexpressed along V24A or R187C.

A distinctive feature of some AQP2 mutations, known as dominant negative effect, is found when a mutated form of the protein combines with and sequesters its wild-type counterpart within intracellular stores. This relation between wild-type and mutant forms of AQP2 results in a decrease of properly targeted AQP2 channels with concomitant lack of function. In order to further investigate interrelations within AQP2 variants, we have measured the water permeability of oocytes injected with a fixed 1ng cRNA coding for AQP2-wt along with increasing cRNA concentrations (0-10ng) coding for each mutations under study (Figure 6). The profiles found for both K228E (panel A) and V24A

(panel B) are similar; AQP2-wt generates an increase in water permeability over control oocytes which was gradually enhanced by the addition of increasing cRNA coding for either mutations. Addition of 10ng mutant cRNA increases the wild-type induced permeability by  $14.9 \pm 2.9 \cdot 10^{-4}$  cm/s and  $9.4 \pm 4.0 \cdot 10^{-4}$  cm/s for K228E and V24A respectively. These inductions are compatible with Pf values determined previously with independent expressions of same mutants (Figure 3, panel A). On the other hand, results found when coinjecting R187C (panel C) are completely opposite with AQP2-wt dependent Pf gradually decreasing to background levels (water-injected oocytes) within 10ng R187C cRNA ( $7.0 \pm 5.1 \cdot 10^{-4}$  cm/s). While coexpressions of wild-type and mutants AQP2 reflect the prevailing conditions found for heterozygote members in both families studied, the figure 7 presents analyses of coexpressions representing the two affected conditions. In both assays, a standard 1ng cRNA for either K228E (panel A) or V24A (panel B) is challenged against increasing concentrations of R187C (0 to 10 ng). Once again, R187C drastically diminishes the Pf values of both K228E ( $-9.0 \pm 1.8 \cdot 10^{-4}$  cm/s, and V24A ( $-4.1 \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$  cm/s). Although the effect of R187C on the three forms of AQP2 tested is similar, its inhibitory action against both mutants is more pronounced with Pf reductions evidenced at a 1:1 ratio for both K228E and V24A (Figure 7A and B) while a 1:5 ratio is necessary to reach a similar effect with AQP2-wt (Figure 6C).

## DISCUSSION

Many mutations responsible for NDI have been identified so far and expression in *Xenopus* oocytes has proven to be a tool of choice for both biochemical and functional studies. Key pathophysiological data related to NDI, such as misrouting or inadequate processing of the altered AQP2 protein, were identified using this technique (16, 22). These forms of NDI are usually transmitted to lineage as a recessive trait. Although expressing AQP2 mutations in oocytes is not expected to reproduce actual phenotypes reported by affected individuals, coexpression studies have permitted to highlight some important features related to this condition. One important trait sometimes found in AQP2-related NDI is the dominant negative behaviour where a defective subunit associates with its functional counterpart(s) and impedes the normal processing and/or targeting of the oligomer, thus sequestering the complex in internal stores and preventing the normal activity of the whole (20). These mutations, essentially located at the C-terminal end of the protein, are responsible for the autosomal dominant form of transmission of NDI. A few reports in the past have presented such interactions between wild-type and mutated forms of AQP2, usually through co-immunoprecipitation assays (9, 11, 17).

The present study focuses on two new mutations identified from distinct families, K228E and V24A, along with R187C, found in both families and already reported in the literature. As indicated in clinical data, only the individuals presenting compound mutations (K228E + R187C and V24A + R187C) are affected with NDI and since heterozygotes are not affected, no dominant negative behaviour of pathological impact is suspected for these mutations. The schematic representation of the AQP2 protein in Figure 8 locates all three mutations under study. V24A, situated within the first transmembrane domain, represents a modest modification since alanine is also a

nonpolar amino acid of smaller size than valine. Functionality for that mutant form is thus not surprising. On the other hand, R187C is located immediately after the second NPA motif which is implicated in the binding and transfer of water molecules. Hence, replacing a large basic amino acid (arginine) for a small neutral one (cysteine) at such a sensitive location represents a profound modification most inclined to alter the protein's functionality. The last mutant, K228E, is located at the C-terminal end of the protein, near the last transmembrane domain. Even though this mutation implies changing a bulkier basic lysine for a smaller glutamic acid, and thus changing the charge of the residue, this amino acid is found in a region of low secondary structure which may be more compliant to such modifications.

We thus set to characterize these new mutations, looking at functionality, maturation and targeting properties, with the goal of identifying the means by which each mutation operates. We thus performed a series of AQP2 expressions in oocytes and mammalian cells using wild-type and mutated proteins either in pure or mixed conditions, in accordance with the genotypes depicted in Figure 1.

#### *Processing, functionality and targeting of mutated AQP2.*

The figure 3 presents an overall characterization of AQP2 expression in oocytes and describes both the synthesis and targeting of the protein as well as their functionality as water channels. As seen in panel B, all AQP2 variants are adequately synthesized, presenting a typical 29kDa band as the major product along a 31kDa band of uneven intensity depending on the AQP2 variant tested. This 31kDa band, signature to a glycosylation intermediate, is indicative of an impaired maturation of the protein somehow hindered in its normal maturation process (4). As in oocytes only one out of four AQP2 units is estimated to be glycosylated, the remaining 75% is believed to be readily expressed without

any posttranslational step (glycosylation). Also in oocytes, the wild-type AQP2 matures rapidly (7) and consequently, only a faint 31kDa band can sometimes be evidenced (AQP2-wt lane in this blot). At its place, a mature glycosylated broad band of 39-45kDa is occasionally found in oocytes (not shown here). When comparing the 31kDa and the 29kDa bands for all three mutants to evaluate post-translational processing, we find that K228E and V24A both have moderate intermediate species (31kDa) while R187C usually display a more pronounced 31kDa band. This underlines possible synthesis difficulties for this mutant which correlates with the fact that R187C is the only ER retained mutant in this study as shown by plasma membrane targeting analysis (panel C). Note that only the 29kDa band successfully reaches the plasma membrane. This is in agreement with the accepted notion that the 31kDa intermediate band is retained in intracellular stores and most probably destined to degradation. When comparing functionality (Pf values) against plasma membrane expression levels (AQP2 densitometry in Western blots of purified plasma membrane fractions) it is estimated that all AQP2 variants, with the exception of R187C which cannot be evaluated here, display appropriate unitary water transport capacities. Although the relative value of 1.7 determined for K228E (AQP2-wt = 1) may point to an actual increase in the protein's efficacy, we believe this value to be too close to 1 and needs to be substantiated further before concluding in an actual increase in unitary water transport value for that mutant. Also, through densitometry ratio evaluations of plasma membranes over total membranes we have determined that, in oocytes, both K228E and V24A are appropriately targeted to the plasma membrane similar to AQP2-wt (ratio of 1.2 in comparison to wild-type for both mutations) thus indicating that the targeting process for both mutants is not defective, at least in this system. We thus conclude for the time being that both K228E and V24A are functional AQP2 variants, similar to the wild-type protein. In comparison to AQP2-wt, when considering functionality (equivalent), plasma membrane targeting (equivalent) and protein synthesis (20-40%), we find that K228E and V24A are the two

most efficiently expressed AQP2 mutations evidenced so far. Previous data, including ours (6), globally reports overall efficiencies of about 1/10 or less (16, 20). With such functionality levels, V24A and even more with K228E could basically be considered as modest but functional variants of AQP2, which would not explain the NDI phenotype observed in compound mutation individuals.

By expressing AQP2 variants in mIMCD-3 cells, a more relevant cell system of medullary origin, we found that the plasma membrane targeting properties of both K228E and V24A does not correlate with those already determined in oocytes. Despite forskolin treatment, V24A completely fails to reach the membrane while only about 20% of the K228E-expressing cells present plasma membrane labeling (Figure 4, lower panel). AQP2-wt on the other hand is readily targeted at the plasma membrane by the same treatment (over 90% positive labeling,  $n > 50$ ) as opposed to R187C which remains in intracellular stores after treatment. Our data shows that R187C does not reach the plasma membrane in neither oocytes (figures 3C-D and 5) nor mIMCD-3 cells (Figure 4), which is in agreement with other reports using the same systems (17, 18, 22, 23). Even though oocytes and mammalian cells usually generate similar plasma membrane targeting results for AQP2 mutants (6), the diverging targeting results found with K228E and V24A underline existing differences between both expression systems and stress the need to confirm key features such as targeting using a more appropriate cell model such as mIMCD-3 cells. Thus, even though both K228E and V24A are functional proteins, the basic defect most probably resides in their profound inability to adequately reach the plasma membrane, possibly worsened by a weak protein synthesis level (20 to 40% in comparison to AQP2-wt, in oocytes), and a possible lack of maturation. In heterozygote individuals, the wild-type protein is believed to compensate for the non-functional K228E and V24A mutations which is not possible in compound mutations comprising R187C, as found in the affected individuals in

both family cases. Although some reports have presented mutations (A147T, L22V) where defects essentially originate from inadequate synthesis of a functional AQP2 variant (18, 22), mistargeting is the usual means by which mutated forms of AQP2 operates (17, 19, 20).

#### *Coexpression studies.*

AQP2 is expressed at the plasma membrane as a homotetramer and the relations between subunits may become critical, as displayed with the dominant negative effect. Hence, coexpression analyses combining wild-type and mutant elements may highlight some of the molecular aspects of the protein's functionality and even relate to actual clinical situations. For that reason, coexpression analyses were performed combining the different AQP2 species to reflect conditions depicted for both families herein. In a first study, combinations of cRNA were performed based upon respective translation efficiencies (1 unit for AQP2-wt and 5 units for all mutants) in order to evaluate the possible interactions between AQP2 variants, as was done previously in a similar case study (6). We consider this approach only as indicative since we can merely speculate on the actual expression properties (both quantitatively and qualitatively) of these AQP2 forms, as found in the actual individuals, in pure or combined expressions. Nevertheless, the Western blots performed on purified plasma membrane fractions (Figure 5) indicates that the wild-type protein is adequately synthesized and routed to the plasma membrane within all conditions of expression. Through visualization of AQP2-wt using an HA tag (lower blots in Figure 5A and B), it can be shown that both K228E and V24A enable, and possibly even promote, the plasma membrane insertion of the wild-type protein. This data confirms that the chosen ratio of 1:5 for wild-type over mutant cRNA did not impede the normal expression of AQP2-wt through synthesis competition, as cautioned previously (10). In coexpression analyses where 1ng AQP2-wt was coinjected with increasing amounts of all three

mutants (Figures 6A and B), we find a gradual increase in water permeability for both K228E and V24A (mean Pf increase =  $14.9 \pm 2.8$  and  $9.4 \pm 4.0 \cdot 10^{-4}$  cm/s, respectively) which adequately represent the sum of individual activities, indicating again that there is no effective competition for synthesis between wild-type and mutant forms of the protein. On the other hand, in same conditions, R187C seems to impede or restrain AQP2-wt expression and targeting, as seen in both functionality and Western blots (Figures 5A-B), which was not expected since this mutant is not supposed to directly interact with AQP2- wt due to its monomeric nature (11). Since the synthesis of AQP2-wt was shown not to be affected by the presence of 5ng cRNA of either K228E or V24A, similar results were expected from R187C since it displays the same synthesis efficacy than the two others (Figure 2B). In following studies, increasing R187C cRNA loads against 1ng AQP2-wt was shown to gradually diminish its functionality down to background level (Figure 6C, mean Pf decrease =  $7.0 \pm 5.1 \cdot 10^{-4}$  cm/s), a behaviour also found with both K228E and V24A (Figures 7A and B). Again, this loss of function was not believed to be secondary to direct competition in protein synthesis from overloaded machinery since K228E and V24A fail to do so in similar conditions (Figures 6A and B). These results indicate that R187C, which is not targeted to the plasma membrane, can impede the functionality of any of the other AQP2 species tested herein. The inability for R187C to multimerize basically forbids the dominant negative effect usually proposed to explain the retention of the wild-type protein and, since the coexpression conditions do not seem to significantly impede wild-type protein synthesis, other mechanisms leading to interference in the normal processing of AQP2-wt are to be explored, possibly implicating protein maturation and targeting features

In this study, the two new AQP2 mutations, K228E and V24A, display high levels of functional expression for mutant forms (between 20 and 40% of wild-type) along adequate plasma membrane targeting in oocytes but not in mIMCD-



3 cells where they are largely (K228E) or completely (V24A) restrained within internal stores. Mistargeting is thus believed to be responsible for the lack of functionality for both these mutants. Since both have adequate plasma membrane targeting in oocytes but not mIMDC-3 cells, K228E and V24A are valuable candidates for recovery assays using strategies such as chemical chaperones to promote protein synthesis efficiency (22). R187C shows mistargeting in both expression models tested and may also interfere with the normal processing of both mutant and wild-type proteins. Further investigations regarding the synthesis and cellular management of R187C could provide key information in relation to the normal expression of AQP2-wt. Still, as heterozygotes of both families are not affected, we can only conclude that the deleterious effects of these mutations, including R187C, do not supersede the basic functionality of AQP2-wt.

## REFERENCES

1. **Bissonnette P, Noel J, Coady MJ, and Lapointe JY.** Functional expression of tagged human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2: 359-371, 1999.
2. **de Mattia F, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ, Konings IB, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A, and Deen PM.** Lack of Arginine Vasopressin-Induced Phosphorylation of Aquaporin-2 Mutant AQP2-R254L Explains Dominant Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2005.
3. **Deen PM, Croes H, van Aubel RA, Ginsel LA, and van Os CH.** Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 95: 2291-2296, 1995.
4. **Deen PM, van Balkom BW, and Kamsteeg EJ.** Routing of the aquaporin-2 water channel in health and disease. *Eur J Cell Biol* 79: 523-530, 2000.
5. **Duquette PP, Bissonnette P, and Lapointe JY.** Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3796-3801, 2001.
6. **Guyon C, Lussier Y, Bissonnette P, Leduc-Nadeau A, Lonergan M, Arthus MF, Bedoya Perez R, Tiulpakov A, Lapointe JY, and Bichet DG.** Characterization of D150e and G196d Aquaporin-2 Mutations Responsible of Nephrogenic Diabetes Insipidus; Importance of a Mild Phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009.
7. **Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BW, Oorschot V, Klumperman J, Deen PM, and van der Sluijs P.** Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 2975-2983, 2004.
8. **Kamsteeg EJ, Bichet DG, Konings IB, Nivet H, Lonergan M, Arthus MF, van Os CH, and Deen PM.** Reversed polarized delivery of an aquaporin-

2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Biol* 163: 1099-1109, 2003.

9. **Kamsteeg EJ, and Deen PM.** Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 683-690, 2001.

10. **Kamsteeg EJ, and Deen PM.** Importance of aquaporin-2 expression levels in genotype -phenotype studies in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F778-784, 2000.

11. **Kamsteeg EJ, Wormhoudt TA, Rijss JP, van Os CH, and Deen PM.** An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Embo J* 18: 2394-2400, 1999.

12. **Kuwahara M, Iwai K, Ooeda T, Igarashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shinbo I, Uchida S, Terada Y, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Bichet DG, Marumo F, and Sasaki S.** Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus. *Am J Hum Genet* 69: 738-748, 2001.

13. **Leduc-Nadeau A, Lahjouji K, Bissonnette P, Lapointe JY, and Bichet DG.** Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006.

14. **Levin MH, Haggie PM, Vetrivel L, and Verkman AS.** Diffusion in the endoplasmic reticulum of an aquaporin-2 mutant causing human nephrogenic diabetes insipidus. *J Biol Chem* 276: 21331-21336, 2001.

15. **Lin SH, Bichet DG, Sasaki S, Kuwahara M, Arthus MF, Lonergan M, and Lin YF.** Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2694-2700, 2002.

16. **Marr N, Bichet DG, Hoefs S, Savelkoul PJ, Konings IB, De Mattia F, Graat MP, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Knoers NV, Landau D, Balfe WJ, Oksche A, Rosenthal W, Muller D, Van Os CH, and Deen**

**PM.** Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 13: 2267-2277, 2002.

17. **Marr N, Bichet DG, Lonergan M, Arthus MF, Jeck N, Seyberth HW, Rosenthal W, van Os CH, Oksche A, and Deen PM.** Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Mol Genet* 11: 779-789, 2002.

18. **Marr N, Kamsteeg EJ, van Raak M, van Os CH, and Deen PM.** Functionality of aquaporin-2 missense mutants in recessive nephrogenic diabetes insipidus. *Pflugers Arch* 442: 73-77, 2001.

19. **Mulders SM, Bichet DG, Rijss JP, Kamsteeg EJ, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara M, Morgan K, Leijendekker R, van der Sluijs P, van Os CH, and Deen PM.** An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J Clin Invest* 102: 57-66, 1998.

20. **Robben JH, Knoers NV, and Deen PM.** Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F257-270, 2006.

21. **Shinbo I, Fushimi K, Kasahara M, Yamauchi K, Sasaki S, and Marumo F.** Functional analysis of aquaporin-2 mutants associated with nephrogenic diabetes insipidus by yeast expression. *Am J Physiol* 277: F734-741, 1999.

22. **Tamarappoo BK, and Verkman AS.** Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J Clin Invest* 101: 2257-2267, 1998.

23. **Yamauchi K, Fushimi K, Yamashita Y, Shinbo I, Sasaki S, and Marumo F.** Effects of missense mutations on rat aquaporin-2 in LLC-PK1 porcine kidney cells. *Kidney Int* 56: 164-171, 1999.

## LEGENDS

FIGURE 1: A- *segregation of AQP2 alleles in two families*. Genotypes presenting segregation of both wild-type (empty symbols) and mutated (filled symbols) forms of AQP2 in the two families tested. Clinical evaluation indicates that only individuals with compound mutations are affected with NDI. *N* indicates normal alleles.

FIGURE 2: *expression of AQP2 variants in X. laevis oocytes*. Panel A: Western blot of oocytes injected with increasing amounts of cRNA for wild-type (0.5, 1 and 2ng) and mutated forms (1, 2 and 5ng) of AQP2. Each lane represents total membranes from 4 oocytes. Panel B: Densitometry evaluation of AQP2 bands extracted from panel A and correlated against cRNA quantities. Data represents typical results from triplicates and fitted to monoexponential equation.

FIGURE 3: *expression of AQP2 variants in X. laevis oocytes*. Panel A: functional evaluation of all AQP2 variants. Oocytes were injected with cRNA coding for either wild-type (WT, 1ng) or mutated (V24A, R187C and K228E, 5ng) AQP2 along controls (Ctrl) and incubated for 72 hours prior to testing for water permeability capacities (see methods).  $P_f$  values are in  $10^{-4}$  cm/s and represent 7-8 determinations per condition. Data are representative of three individual assays. The same oocytes were tested in Western blot using either total membranes (panel B, 1 oocyte per lane) or purified plasma membranes (panel C, 40 oocytes per lane) fractions. PDI detection was performed on the same material to confirm the quality of the purification procedure for plasma membrane in panel C. Panel D: Immunofluorescence labeling of all AQP2 in same samples showing retention of R187C within intracellular stores as opposed to AQP2-wt, V24A and K228E.

FIGURE 4: *Immunofluorescence analysis of AQP2 in transfected IMCD3 cells.* mIMCD-3 cells were transfected with pcDNA6-AQP2-wt, -V24A, -R187C or – K228E, incubated for 16-24 hours and treated (+forskolin) or not (- forskolin) with forskolin (50 $\mu$ M, 45 min.) prior to fixation. PDI was used as an ER marker (red) and DAPI was used as a nuclear stain (blue). Plasma membrane staining are found for both AQP2-wt and -K228E (filled arrows) but not for R187C or V24A. Magnification 60 X.

FIGURE 5: *expression of AQP2 in relation to family genotypes.* Oocytes were injected with AQP2 cRNA combinations in accordance to figure 1 reproducing genotypes presented for family 1 (panel A) and family 2 (panel B). In respect to translation efficiency, cRNAs were injected at 1ng (AQP2-wt) or 10ng (mutant) with exception of double mutant conditions (K228E + R187C and V24A + R187C) where both mutant were injected at 5ng each. Functionality was evaluated using a mild hypo-osmotic shock (20 mOsm). Pf values are in 10<sup>-4</sup> cm/s and represent 7-8 determinations for each condition. Data are representative of three individual assays.

FIGURE 6: *functionality of AQP2-wt in coexpression studies.* A standard 1ng AQP2-wt cRNA was injected along increasing concentrations (0-10ng) cRNA for K228E (panel A), V24A (panel B) or R187C (panel C) and water permeability was evaluated using a 20 mOsm hypo-osmotic shock. Pf values are given in 10<sup>-4</sup> cm/s and represent 7-8 determinations for each condition. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ) in comparison to pure 1ng AQP2-wt value while # indicates non-significance from controls ( $p < 0.05$ ). Data are representative of three individual assays.

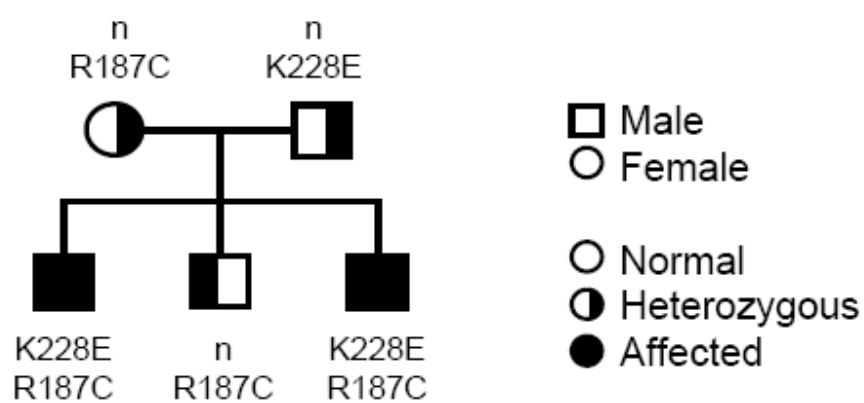
FIGURE 7: *functional analysis of mutant AQP2 in coexpression studies.* 1ng cRNA for either K228E (panel A) or V24A (panel B) was injected along increasing concentrations of R187C cRNA (0-10ng) and water permeability

was evaluated using a 20 mOsm hypo-osmotic shock. Pf values are given in  $10^{-4}$  cm/s and represent 7-8 determinations for each condition. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ) in comparison to pure 1ng AQP2-wt value while # indicates non-significance from controls ( $p < 0.05$ ). Data are representative of three individual assays.

FIGURE 8: *Schematic representation of AQP2 protein.* Depiction of the human AQP2 protein showing the positions for V24A, R187C and K228E mutations. Brackets indicate conserved NPA motifs.

FIGURE 1

## Family 1



## Family 2

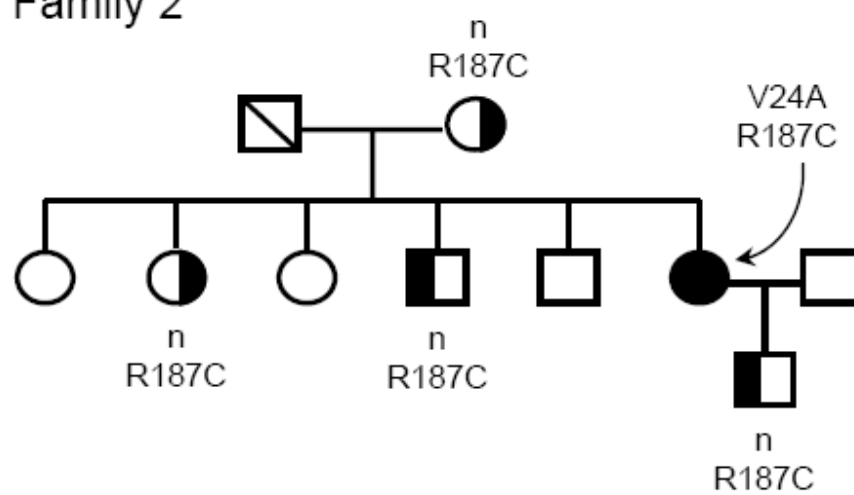




FIGURE 2

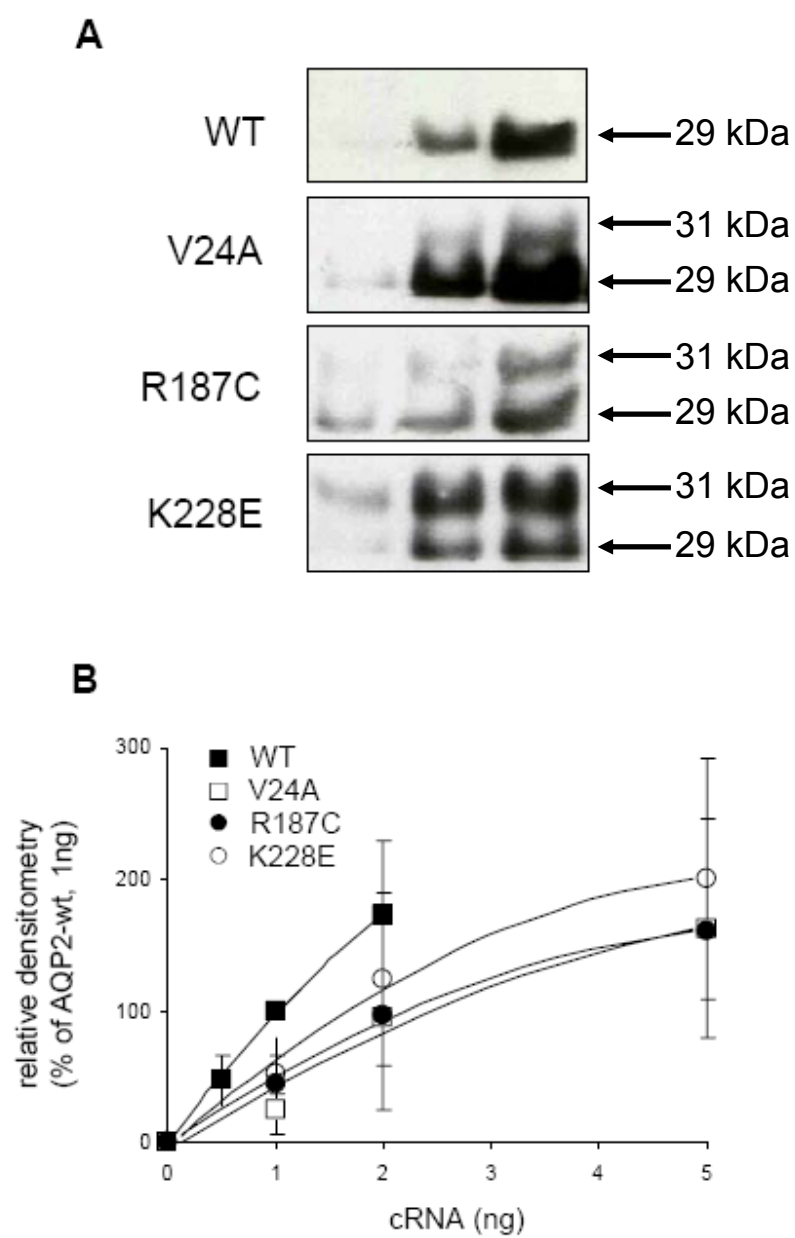


FIGURE 3

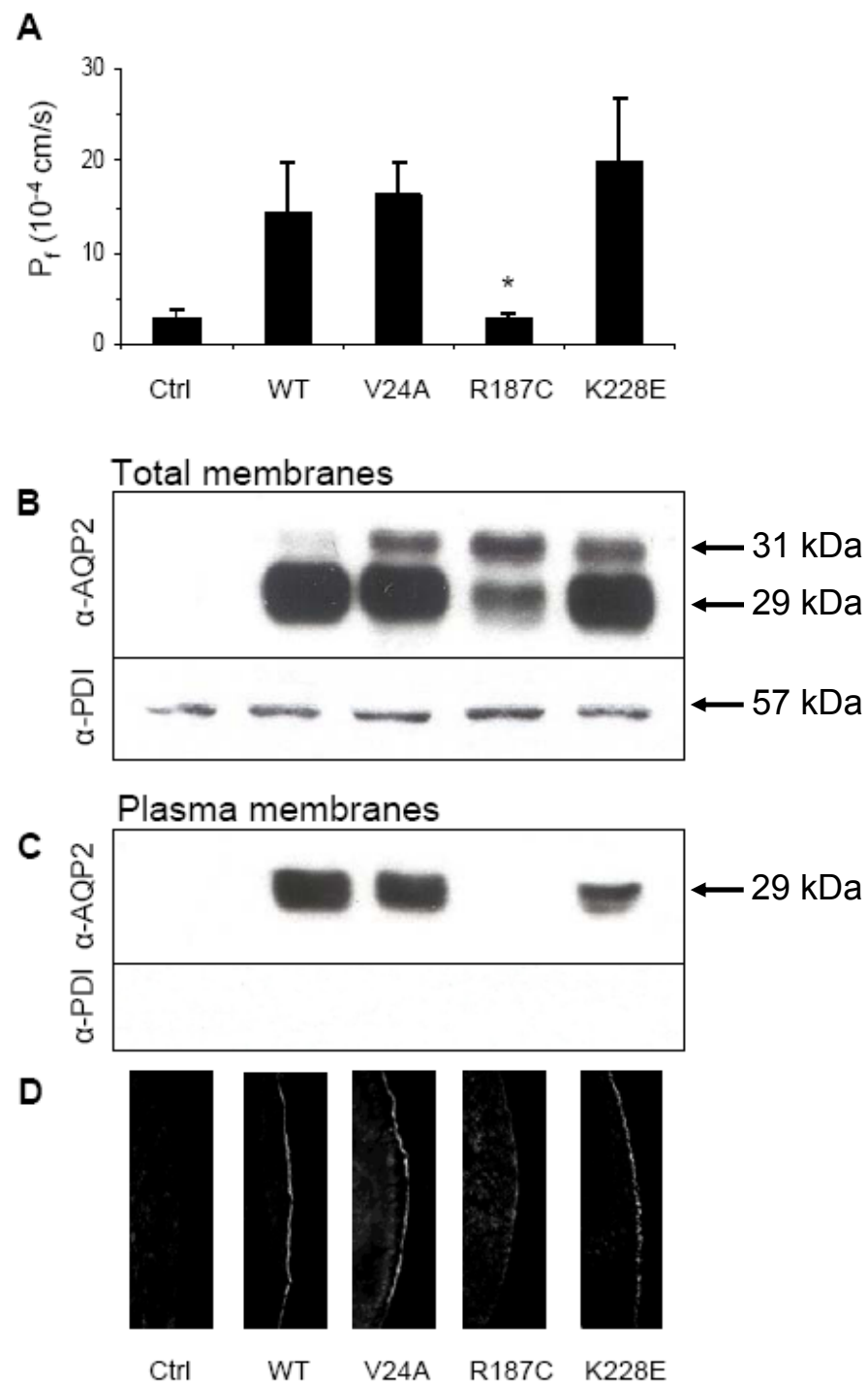


FIGURE 4

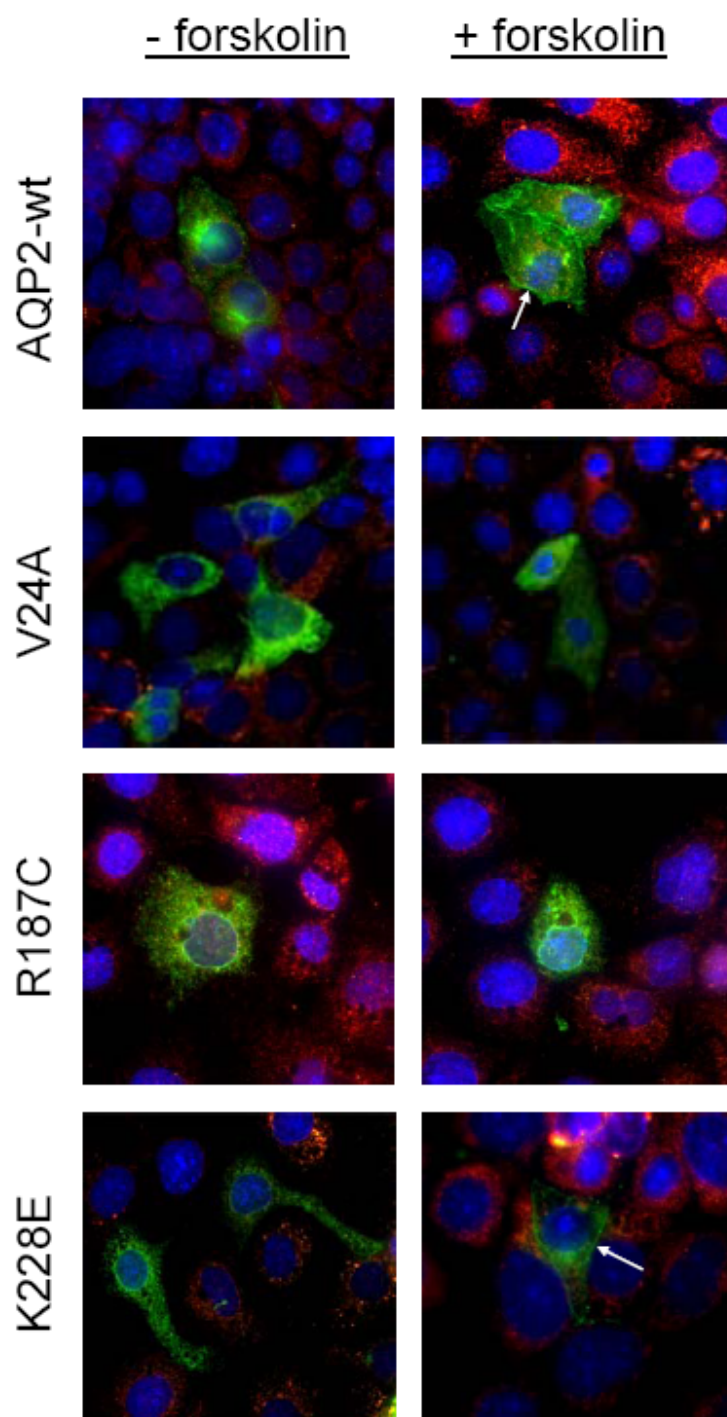


FIGURE 5

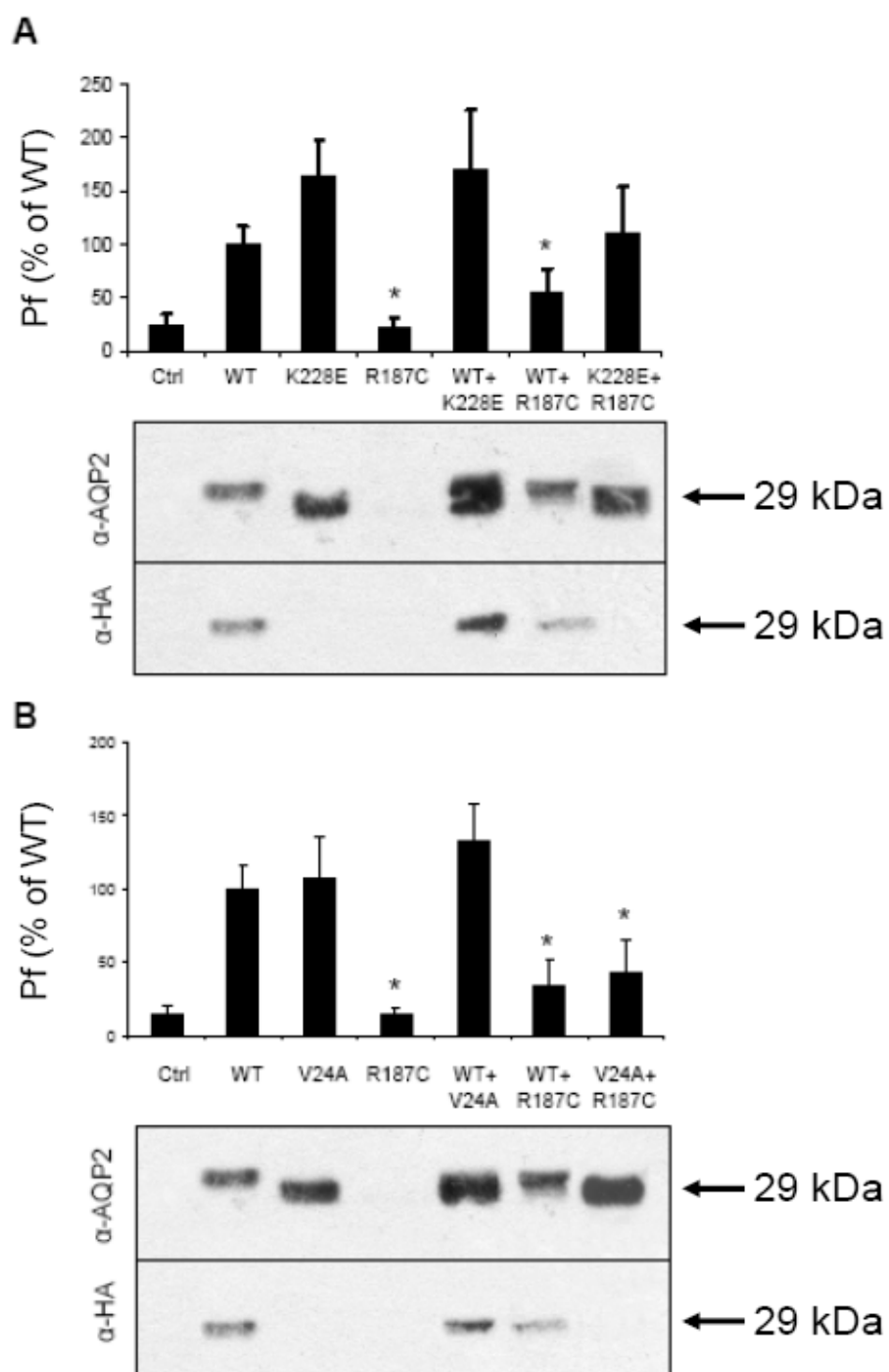


FIGURE 6

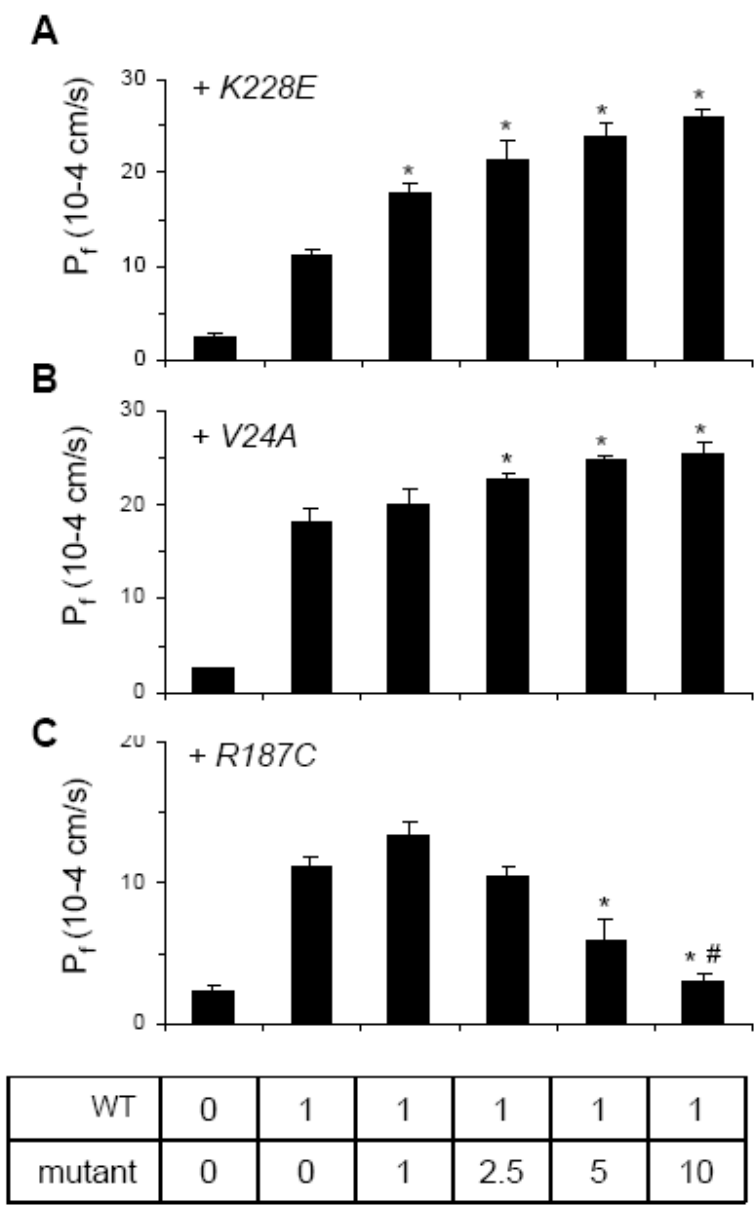


FIGURE 7

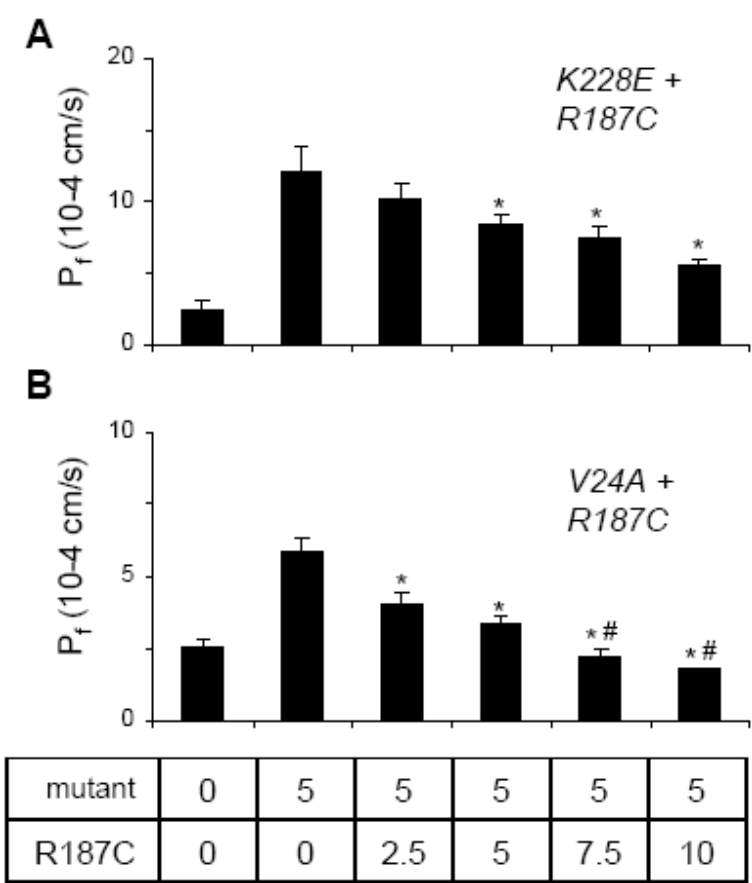
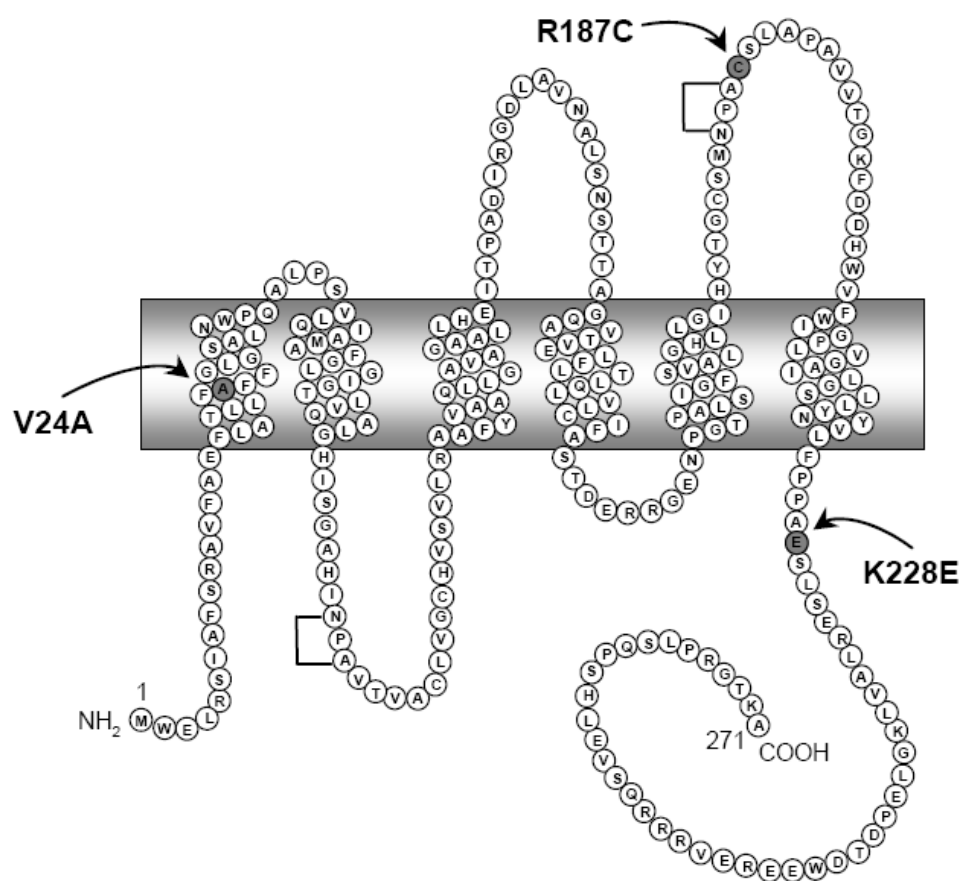


FIGURE 8



### 3. Discussion

3.1 Premier article « Elaboration of a novel technique for purification of plasma membrane from *Xenopus laevis* oocytes. »

#### 3.1.1 Mise en contexte

Les ovocytes de *Xenopus laevis* sont largement utilisés dans le cadre d'études sur les canaux et les transporteurs. Plus particulièrement, l'analyse des propriétés d'adressage à la membrane plasmique est d'une grande pertinence dans le contexte d'études portant sur les propriétés patho-physiologiques de formes mutantes. En effet, tel que mentionné précédemment, le défaut d'adressage est la cause première de perte de fonction associée aux formes mutantes (Deen, Croes et al. 1995). Cependant, à ce jour, aucune technique simple et rapide ne permettait l'obtention de membranes plasmiques présentant un degré de pureté acceptable. Les techniques existantes sont soit trop longues, nécessitant la séparation manuelle de la membrane vitelline de l'ovocyte à l'aide de pinces, ou sont élaborées pour une très grande quantité d'ovocytes (400-1000), rendant celle-ci inappropriée lors d'analyse portant sur des ovocytes injectés individuellement. À cet égard, le besoin de développer une technique de purification de membrane plasmique des ovocytes *Xenopus laevis* devenait évident.

#### 3.1.2 Considérations techniques

La présente technique a été améliorée à partir de deux techniques préexistantes. La première étape consiste à effectuer une digestion enzymatique partielle de la membrane vitelline par l'enzyme subtilisine A. Cette technique de perméabilisation de la membrane a été initialement élaborée pour permettre l'étude de protéines membranaires tel que le canal de potassium ROMK lors



d'expériences où la technique de « patch-clamp » est utilisée (Choe and Sackin 1997). Dans le contexte de la purification de la membrane plasmique, cette étape a pour but de relâcher ou d'affaiblir le maillage constitué par les protéines de la membrane vitelline afin de faciliter l'accès à des agents polymérisants entre la vitelline et la membrane plasmique. La seconde étape consiste à créer un complexe polymérisé associant les membranes vitelline et plasmique grâce à un traitement séquentiel avec une solution de Ludox 1% et d'acide polyacrylique 0.1%. Une homogénéisation douce effectuée à la pipette Eppendorff (p200) des ovocytes ainsi traités permet d'obtenir de grands feuillets de membranes faciles à séparer du reste des constituants intracellulaires via une série de courtes centrifugations à faibles vitesses.

Au-delà de représenter le sujet central de ce travail, le choix de l'AQP2 comme protéine témoin pour la mise au point de cette technique de purification de membranes plasmiques s'est avéré judicieux à plus d'un sens; d'une part, l'AQP2 est constitutive, s'exprime de façon rapide, en abondance et est nullement délétère pour l'ovocyte, du moins à l'intérieur de 4 à 5 jours d'expression. De plus, la détection par immunobuvardage est particulièrement sensible et ne démontre aucun bruit de fond nuisible pouvant confondre le signal. L'expression de l'AQP2 a donc permis d'opérer un suivi efficace lors de la mise au point de cette technique.

### 3.1.3 Avantages de la technique

Cette nouvelle technique offre plusieurs avantages à l'égard de celles déjà proposées dans la littérature. De par l'absence de manipulation fine (enlèvement de la membrane vitelline), les traitements aisés et les centrifugations rapides, nous pouvons rapidement obtenir des fractions membranaires plasmiques d'un haut degré de purification sans évidence de contaminations issues de membranes internes. De plus, cette technique

s'adapte aisément à des quantités variables d'ovocytes variant de 10 à plus de 100. La rapidité d'exécution permet aussi d'isoler la membrane plasmique de plusieurs ovocytes exprimant différentes protéines en aussi peu qu'une demi-journée de travail.

De plus, tel que l'indique la figure 2 des échantillons équivalents (40 ovocytes dans le cas présent) démontrent des signaux proportionnels aux quantités croissantes d'ARNc d'AQP2 injectés. La technique permet donc de rendre compte efficacement de variabilités d'expression au sein d'échantillons similaires.

#### 3.1.4 Les limites de la technique

Il nous est impossible de dire si les fractions membranaires plasmiques obtenues par cette technique sont exemptes de tout contaminant. Nous avons par contre choisi d'utiliser la « protein disulfide isomerase » (PDI) comme témoin de contamination intracellulaire, soit une protéine impliquée dans le repliement des protéines à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE). Nous avons choisi une protéine résidante du RE puisque ce compartiment intracellulaire représente la fraction membranaire intracellulaire majeure de l'ovocyte, et donc le contaminant le plus probable. Ainsi, la présence d'un signal PDI dans les analyses d'immunobuvardage indiquerait la présence d'une contamination dans l'échantillon de membrane plasmique. L'absence d'un tel signal dans les échantillons purifiés (figure 3B) en opposition au signal très net lorsqu'évalué sur homogénat démontre clairement l'efficacité de la procédure de purification. Il est vrai que d'autres contaminants potentiels pourraient être présents puisque le risque de contamination est réel si l'homogénéisation n'est pas faite rigoureusement et si le maximum de surnageant n'est pas prélevé après chaque centrifugation. De plus, le niveau de pureté ou la qualité de l'échantillon obtenu peut aussi dépendre de la qualité des ovocytes utilisés; si

ces derniers ont été trop endommagés par le traitement à la collagénase ou par le traitement à la subtilisin A, il peut y avoir une perte de l'intégrité de la membrane plasmique qui altère la qualité du produit final ou encore pourra entraîner certains contaminants dans la fraction correspondant aux membranes plasmiques. Par exemple, si la membrane plasmique est percée par un des traitements, au moment de la polymérisation, il est possible qu'il y ait formation de complexe entre les compartiments intracellulaire et la membrane plasmique.

### 3.1.5 Validation de la technique

Afin de valider la technique, des formes natives et mutantes du canal AQP2 ainsi que celles du cotransporteur  $\text{Na}^+$ /glucose (SGLT1) et du « transient receptor potential vanilloid 5 » (TRPV5) ont été utilisées. Des études antérieures ont démontré que les formes mutantes des protéines testées ici sont soit non-fonctionnelles ou incapables de se rendre à la membrane plasmique (Dodier, Banderali et al. 2004; Gagnon, Bissonnette et al. 2006), étant séquestrées à l'intérieur du RE, à l'exception de la mutation D150E de l'AQP2 qui n'est que faiblement présente à la membrane. Ce test de validation conforte la conviction que cette technique puisse être exploitée pour l'étude d'autres protéines exprimées dans ce système. En fait, les protéines choisies ici ne présentent pas les mêmes taux d'expression ni les mêmes qualités de visualisation en immunobuvardage. Néanmoins, nous en concluons que cette technique permet l'obtention de matériel en quantité et qualité adéquates pour l'étude de protéines membranaires. Cependant, les résultats obtenus sont tributaires de la qualité de détection en immunobuvardage et donc des anticorps utilisés.

L'étude de fonctionnalité (analyse de perméabilité à l'eau) présentée à la figure 3A démontre que la forme native de l'AQP2 (WT-AQP2) est très active, le

mutant D150E est peu actif et le mutant G196D est totalement inactif. Puisque le défaut premier des mutants AQP2 en est un d'adressage, il était attendu que la présence des formes protéiques à la membrane plasmique soient à l'image de leurs fonctionnalités respectives. Nous fûmes ainsi confortés de constater que les résultats d'immunobuvardage représentaient le même constat : présence forte du WT-AQP2, partielle pour le D150E et absence totale du mutant G196D, indiquant du même coup que la forme native se retrouve à la membrane plasmique tout comme, dans une moindre mesure, le D150E alors que le G196D demeure séquestré dans les organelles internes, probablement le RE (Lussier, Bissonnette et al. 2005). Ceci souligne la question de l'utilisation de cette technique dans un contexte qualitatif. Nous croyons qu'il est effectivement possible d'obtenir de tels résultats qualitatifs mais cette possibilité est essentiellement reliée aux propriétés de détection en immunobuvardage et donc finalement à la qualité des anticorps utilisés.

À l'image des analyses sur AQP2 les deux autres modèle étudiés pour la validation de la technique, SGLT1 et TRPV5 (figures 4 et 5), corroborent les résultats obtenus avec l'AQP2, à savoir que seulement les formes natives sont présentes à la membrane plasmique et que les formes mutées restent quant à elles séquestrées à l'intérieur du RE, en accord avec les données de la littérature qui conclut qu'elles sont non-fonctionnelles (Dodier, Banderali et al. 2004; Gagnon, Bissonnette et al. 2006). Nous sommes donc confiants quant aux capacités et à la portée éventuelle de cette technique. Nous croyons que celle-ci permettra l'étude d'adressage à la membrane plasmique d'une grande variété de protéines membranaires, natives comme mutantes.

### 3.2 Deuxième article “Autosomal recessive mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with apparent normal expression in *Xenopus* oocytes.”

#### 3.2.1 Mise en contexte

Chez les deux familles à l'étude, seuls les individus possédant deux mutations (V24A-R187C et K228E-R187C) sont atteints du DIN. Dans les deux cas, les mutations ne se retrouvent pas dans le même exon et ne sont pas dû à des phénomènes d'épissage, en fait une sous-unité ne porte qu'une mutation. À première vue, on ne peut parler d'effet dominant négatif étant donné l'absence de DIN chez les parents hétérozygotes. Les mutations V24A et K228E n'ont jamais été répertoriées, contrairement à la mutation R187C qui a été présentée à quelques reprises dans la littérature (Deen, Croes et al. 1995; Kamsteeg, Wormhoudt et al. 1999).

Le but de cette étude était de caractériser l'impact de ces mutations sur la biochimie et la fonction de l'AQP2, en exprimant leur ARNc dans les ovocytes de *Xenopus laevis* de manière pure ou combinée selon les génotypes des cas familiaux observés.

#### 3.2.2 Expression, N-glycosylation et contrôle de qualité

L'AQP2 est synthétisée sous forme de monomère fonctionnel dans le RE (Bai, Fushimi et al. 1996). Ces monomères sont assemblés en tétramère (Bai, Fushimi et al. 1996) et il est présumé que seulement un des monomères reçoit une N-glycosylation au site consensus N123-X-T125 (Bai, Fushimi et al. 1996), du moins dans l'ovocyte ou encore chez certains modèles d'expression en lignées cellulaires transfectées. En fait, il en va autrement si on considère les tissus natifs tels que la médulla rénale, les lignées cellulaires exprimant naturellement l'AQP2 (mpkCCDc14). Dans ces cas, c'est plutôt un ratio de

50% de formes glycosylées qui est déterminé. Il est fort probable que le contexte d'expression hétérologue soit responsable d'un tel phénomène. Toujours est-il que, dans le modèle d'expression en ovocyte, la glycosylation n'est nécessaire ni pour la multimérisation ni pour l'adressage à la membrane plasmique. Par contre, il en va autrement dans certaines lignées cellulaires où l'absence de glycosylation entraîne un mauvais adressage du tétramère vers le pôle basolatéral. La question de l'importance de la N-glycosylation demeure donc pertinente et non-résolue. Les protéines chaperonnes du RE ont pour rôle de reconnaître et d'empêcher le transport des AQP2 mal repliées (Marr, Bichet et al. 2002) à la membrane plasmique. En immunobuvardage, la masse d'un monomère non-glycosylé est de 29kDa, tandis qu'un monomère glycosylé de forme riche en mannose, donc toujours résident au RE, est de 31 kDa. Dans l'appareil de Golgi, l'AQP2 subit une maturation de la glycosylation de type complexe lui conférant sa masse finale de 40 à 45 kDa. C'est selon ce principe que les formes mutantes présentent toujours la bande à 31 kDa comme signature distinctive. Cette bande reflète la difficulté pour la protéine mutante à quitter le RE, probablement retenue par les chaperonnes. À l'inverse, la protéine sauvage progresse très rapidement vers le Golgi, d'où l'absence de la bande à 31kDa.

L'immunobuvardage des échantillons de membranes totales, permet d'observer les formes d'AQP2 mutées riches en mannose à 31 kDa. Chez les mutations actives, V24A et K228E, la bande à 29 kDa semblent être plus intense que celle à 31 kDa. Inversement, dans le cas de R187C, la bande à 31 kDa est systématiquement plus intense que celle de 29 kDa. Il semble ainsi y avoir un équilibre particulier entre les formes non-glycosylées et riches en mannose qui est propre à chaque mutant. L'analyse comparative entre le R187C, les autres mutants et la forme sauvage pourrait mettre en perspective certains aspects de la N-glycosylation importants pour la bonne suite de la maturation de l'AQP2. Nous pourrions ainsi étudier l'évolution des transformations à l'aide

d'inhibiteurs spécifiques de la maturation des résidus N-glycosylés en bloquant des enzymes clés telles les glucosidases et mannosidases. Nous pourrions ainsi possiblement déterminer les interactions exactes des protéines assurant le contrôle de qualité du RE avec l'AQP2.

Une des causes importantes du DIN autosomique est l'effet dominant négatif. Celui-ci se décrit comme la liaison entre sous-unités mutées et natives de l'AQP2 entraînant la séquestration du complexe dans les compartiments intracellulaires. Il en résulte une perte de fonction due à l'absence de canaux fonctionnels à la membrane plasmique (Robben, Knoers et al. 2006). Cette problématique de multimérisation de l'AQP2 est particulièrement intéressante puisqu'elle est à l'image d'une kyrielle de protéines à l'origine de nombreuses pathologies basées sur ce même défaut, telle la huntingtine liée à la maladie de Huntington (Rubinsztein 2003), la  $\beta$ -amyloïde associée à l'Alzheimer (Welch and Brown 1996) et la p53 impliquée dans de nombreux cancers (Whibley, Pharoah et al. 2009) par exemple.

### 3.2.3 Phénotypes des mutations V24A, R187C et K228E

Lors d'expériences de perméabilité à l'eau chez les ovocytes, les mutations V24A et K228E démontrent une activité semblable à celle de la forme native seulement lorsqu'elles sont injectées en concentrations d'ARNc cinq fois plus grandes (figure 3). La mutation R187C, quand à elle, ne présente aucune activité intrinsèque et donne une perméabilité à l'eau équivalente à celle des ovocytes témoins. Or, il est étonnant de constater que la littérature cible essentiellement le défaut d'adressage comme élément causal du DIN. Pourtant, dans tous les cas étudiés en ovocyte, on remarque que l'efficacité de synthèse de ces formes mutantes y est déficiente; il faut toujours utiliser de 3 à 10 fois plus de ARNc pour obtenir un taux d'expression protéique qui approxime la forme sauvage. La question de l'efficacité de transcription reste donc entière.

D'une part, il est possible que les ARNc de formes AQP2 mutées ne soient pas aussi stables. Les études effectuées par le groupe de Deen (Deen, Croes et al. 1995) avaient démontré par Northern blot que les ARNc mutants étaient aussi stables que ceux de la forme native. Cependant cette technique n'étant que partiellement quantitative, il serait souhaitable de reproduire ce type d'analyse à l'aide de technique plus rigoureuse telle que la PCR quantitative (qRT-PCR). Ainsi, nous pourrions évaluer la demi-vie des d'ARNc injectées. Par ailleurs, il est tout aussi possible que les ARNc soient stables mais que ce soient les protéines de type mutantes qui manquent de stabilité. Nous pourrions ici par marquage métabolique au  $^{35}\text{S}$  suivre l'évolution des protéines et de leur glycosylation dans le temps. Certaines expériences de stabilité déjà tentées démontrent que le mutant R187C reste séquestré plus longtemps au niveau du RE que la forme native, ce qui explique une forte présence de la forme glycosylée de ce mutant lors d'étude d'immunobuvardage (Hendriks, Koudijs et al. 2004)

Bien qu'en temps normal les résultats d'adressage à la membrane plasmique de mutants de l'AQP2 soient similaires entre les cellules de mammifères et les ovocytes (figure 4) (Guyon, Lussier et al. 2009), il semblerait que ceux obtenus lors de l'expression des mutations –K228E et –V24A génèrent des résultats différents entre les deux systèmes. Ainsi, seulement 20% des cellules transfectées AQP2–K228E démontre un ciblage adéquat à la membrane plasmique suite à un traitement à la forskoline, tandis que la forme –V24A est totalement incapable de s'y rendre, ce qui va à l'encontre des résultats observés dans les ovocytes. Il semblerait que ces deux formes mutantes génèrent des protéines fonctionnelles chez les ovocytes mais qui démontrent de graves problèmes d'adressage dans les cellules de mammifères. Ceci souligne clairement l'existence de différences fonctionnelles entre les deux modèles d'expression utilisés quand aux propriétés d'adressage à la membrane



plasmique. Cependant, dans les deux systèmes, on observe une absence à la membrane plasmique de la forme –R187C.

#### 3.2.4 L'études de coexpression des formes mutées avec les formes natives

La forme native a été injectée avec chacune des trois formes mutantes (figure 5). Par immunobuvardage, nous avons pu évaluer l'interaction entre les différentes formes mutantes et la forme native marquée, quant à elle par l'épitope HA. En effet, ce marquage nous permet d'observer, de distinguer la forme native et donc d'évaluer les interactions qui se produisent entre les différentes formes. De cette façon, nous démontrons que –K228E et -V24A n'affectent pas négativement la synthèse et l'adressage de la forme native contrairement à la forme –R187C qui semble affecter ces deux processus. Cependant, nous considérons que des études supplémentaires devront être effectuées, afin d'expliquer cette interaction.

Dans le but de recréer le phénotype des membres des familles atteintes, des études de perméabilité ont été effectuées sur des ovocytes injectés avec une quantité d'ARNc d'AQP2 natif fixe et de quantités variables d'ARNc d'AQP2 mutée (figure 6). Les quantités croissantes d'ARNc des mutations V24A et K228E provoquent une augmentation de la perméabilité à l'eau des ovocytes. À l'inverse, les quantités croissantes d'ARNc de la mutation R187C induisent une réduction de la perméabilité à l'eau des ovocytes. Ces résultats étaient attendus puisque les mutations V24A et K228E présentent une certaine fonction alors que la forme R187C demeure complètement inactive. De même, afin de recréer le phénotype des individus atteints des mutations, nous avons procédé à des études de co-injection utilisant une concentration stable de la forme mutée V24A ou K228E combiné à des concentrations croissantes de la forme mutée R187C (figure 7). Dans les deux cas, l'augmentation d'ARNc de la forme mutée R187C cause une diminution de la perméabilité à l'eau des ovocytes. Au

premier abord, ces résultats laissent croire que la forme mutée R187C interagit avec les formes mutées V24A, K228E ou même native, et les retiendrait à l'intérieur de la cellule, possiblement le RE, provoquant ainsi une diminution du nombre de molécules AQP2 fonctionnelles à la membrane. Ce résultat va à l'encontre d'une étude présentant R187C comme étant strictement monomérique et donc incapable de former un tétramère (Kamsteeg, Wormhoudt et al. 1999). Une étude d'immunobuvardage effectué à la suite d'une homogénéisation d'ovocytes de *Xenopus laevis* avec gradient de glucose, à permis d'observer la présence de R187C seulement dans la fraction qui représentait les protéines de poids moléculaire de 30 à 60 kDa, ce qui signifie que les sous-unités ne formeraient pas de tétramères. Selon ce résultat, R187C serait tout simplement incapable de retenir une autre sous-unité, mutante ou native, et donc incompatible avec le comportement dominant négatif.

Ceci soulève la problématique du contrôle de l'expression protéique en ovocyte, soit un aspect fondamental dans le cadre de ce genre étude. Tel que souligné par Kamsteeg et al (Kamsteeg and Deen 2000), il est possible que de grandes quantités d'ARNc mutées puissent entraver la synthèse normale de la forme native. Ce genre de comportement permettrait d'expliquer l'effet de dominance négative observée avec la mutation R187C. Dans les études de co-expressions avec les mutations V24A et K228E, on ne peut s'attendre à une réduction globale de fonctionnalité puisque ces formes démontrent d'emblée une certaine activité.

La totalité des études d'expression dans les ovocytes où l'on compare les expressions des formes d'AQP2 mutantes et sauvage ne respectent pas les ratios équitables de cRNA. On favorise en fait un taux d'expression protéique. Or l'impact d'une telle approche n'a pas été vraiment étudié; on choisit de privilégier le taux d'expression en protéine et non la quantité de cRNA injecté initialement. Si on compare au contexte d'expression *in vivo* chez la personne

atteinte, le ratio des ARNm mutants/sauvages, qu'on pourrait d'emblée présumer être de 1 : 1, n'est très certainement pas de 10 : 1. Nous spéculons que la raison pour laquelle il faut injecter une quantité supérieure d'ARN mutée que native est que même si l'ARN injecté n'est pas constitutive, les mécanismes de dégradation des protéines anormales doivent être actifs. Ainsi, il semble donc évident que les études de co-injections en ovocytes, sous de telles conditions, ne peuvent être considérées comme étant représentatives d'une condition réelle telle que retrouvée chez la personne atteinte. Tout au plus servent-elles à démontrer certaines capacités d'interaction. En ce sens, l'utilisation de formes marquées par des épitopes distincts permettrait de mettre en évidence de façon plus formelle les interactions des monomères de formes natives avec ceux de formes mutantes.

#### **4. Conclusion et perspective**

La technique de purification mise au point permet d'obtenir des échantillons de membranes plasmiques avec un minimum de contamination des membranes du RE. De plus, celle-ci est rapide et techniquement aisée, contrairement aux techniques existantes. L'intérêt premier de cette technique concerne les études d'adressage des protéines à la membrane plasmique, soit une problématique centrale associée aux pathologies dues à des défauts génétiques de protéines membranaires. Cependant la principale limite de cette technique se situe au niveau du système de détection utilisé lors de l'immunobuvardage, qui doit être bien rodé afin de jouir au maximum de ce procédé. Néanmoins, nous espérons ainsi que cette contribution technique permettra d'accroître ce type d'étude.

Concernant les deux nouvelles mutations à l'étude, soit V24A et K228E, il semblerait que celles-ci entraînent des variations au niveau de la structure de l'AQP2 qui altèrent peu leur expression en ovocytes étant donné, qu'elles génèrent des formes tout à fait fonctionnelles et à haut taux de synthèse, du

moins pour des formes mutantes. Par contre, dans les cellules mIMCD3, nous estimons que seule une fraction des protéines AQP2-V24A et -K228E sont normalement adressées à la membrane plasmique alors que le reste des protéines se retrouve séquestrées dans le RE. Ces différences notables d'adressage à la membrane entre l'oocyte et la lignée cellulaire mIMCD3 nous indique que ces deux modèles d'analyse ne sont pas nécessairement comparables, du moins en ce qui à trait aux mutants de l'AQP2.

La mutation R187C quant à elle, entrave l'expression adéquate à la membrane plasmique des autres formes mutantes, tout comme de la forme sauvage. Bien que cette mutation présente un comportement d'expression qui soit compatible avec le caractère dominant négatif, celui-ci n'est vraisemblablement pas possible puisqu'il est attendu que R187C n'ait pas la capacité de multimériser, soit une propriété essentielle au caractère dominant négatif. Le phénotype observé en condition de co-injection avec R187C pourrait ainsi plutôt provenir d'un autre type d'interférence dans le processus de maturation normale de l'AQP2 qui pourrait impliquer une interaction avec des chaperonnes ou encore la glycosylation en asparagine.

Chez les patients atteints du DIN, nous démontrons que les formes mutées fonctionnelles (V24A et K228E) comme non-fonctionnelle (R187C) sont retenues en partie ou complètement au niveau du RE tandis que les parents hétérozygotes non atteints du DIN possèdent un allèle sauvage qui leur permet de compenser pour la faiblesse de l'allèle muté.

Des expériences d'étiquetage d'AQP2 permettraient d'observer plus en profondeur l'interaction des monomères des AQP2s mutées et natives. Ces résultats pourraient être observés en immunofluorescence et en immunobuvardage. De plus, il serait très important de réétudier le sort des ARNc injectés dans les ovocytes avec les moyens technologiques actuels, qRT-

PCR par exemple, étant donné que les études ont été effectuées avec des moyens qualitatifs, analyse d'immunobuvardage de type « Northern », plutôt que des mesures quantitatives. Aussi, la mise en évidence de différences fondamentales dans les propriétés d'adressage membranaire plasmique entre les ovocytes et les cellules mIMCD3 nous indique l'existence de systèmes et mécanismes particulier qu'il importe d'élucider pour mieux comprendre la physiologie de l'AQP2. Étant donné cette différence, il faudrait développer une méthode d'analyse qui permettrait de mesurer la perméabilité à l'eau dans les cellules et de normaliser cette valeur par le nombre de protéines totales versus le nombre de protéines à la membrane.

D'autre part, étant donné la fonction des mutations V24A et K228E, il serait intéressant de tester ces protéines avec des chaperonnes chimiques, dans l'optique de sauver les AQP2 mutées. Des antagonistes de l'AQP2 pourrait être utilisés afin de stabiliser, empêcher l'internalisation et la dégradation des formes mutantes, comme il l'a été démontré chez les AVPR2 (Morello, Salahpour et al. 2000).

L'étude des formes mutées de l'AQP2 permet de recenser et de mieux comprendre les différents chemins intracellulaires empruntés par les protéines mal repliées et ainsi de mieux comprendre le diabète insipide néphrogénique.

## Bibliographie

- Agre, P., A. M. Saboori, et al. (1987). "Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen." J Biol Chem **262**(36): 17497-503.
- Agre, P., S. Sasaki, et al. (1993). "Aquaporins: a family of water channel proteins." Am J Physiol **265**(3 Pt 2): F461.
- Amiry-Moghaddam, M. and O. P. Ottersen (2003). "The molecular basis of water transport in the brain." Nat Rev Neurosci **4**(12): 991-1001.
- Arthus, M. F., M. Lonergan, et al. (2000). "Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **11**(6): 1044-54.
- Bai, L., K. Fushimi, et al. (1996). "Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel." J Biol Chem **271**(9): 5171-6.
- Bichet, D. G. (2006). "Nephrogenic diabetes insipidus." Adv Chronic Kidney Dis **13**(2): 96-104.
- Bouley, R., N. Pastor-Soler, et al. (2005). "Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra)." Am J Physiol Renal Physiol **288**(6): F1103-12.
- Bowen-Pidgeon, D., G. Innamorati, et al. (2001). "Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors." Mol Pharmacol **59**(6): 1395-401.
- Brown, D. D. (2004). "A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg." J Biol Chem **279**(44): 45291-9.
- Brown, D. D. and E. Littna (1964). "Rna Synthesis During The Development Of *Xenopus laevis*, The South African Clawed Toad." J Mol Biol **8**: 669-87.
- Canfield, M. C., B. K. Tamarappoo, et al. (1997). "Identification and characterization of aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with partial vasopressin response." Hum Mol Genet **6**(11): 1865-71.
- Carbrey, J. M., D. A. Gorelick-Feldman, et al. (2003). "Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2945-50.
- Carroll, P., H. Al-Mojalli, et al. (2006). "Novel mutations underlying nephrogenic diabetes insipidus in Arab families." Genet Med **8**(7): 443-7.
- Chakrabarti, N., E. Tajkhorshid, et al. (2004). "Molecular basis of proton blockage in aquaporins." Structure **12**(1): 65-74.
- Cheong, H. I., S. J. Cho, et al. (2005). "Two novel mutations in the aquaporin 2 gene in a girl with congenital nephrogenic diabetes insipidus." J Korean Med Sci **20**(6): 1076-8.

- Choe, H. and H. Sackin (1997). "Improved preparation of *Xenopus* oocytes for patch-clamp recording." *Pflugers Arch* **433**(5): 648-52.
- Chou, C. L., K. P. Yip, et al. (2000). "Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores and calmodulin." *J Biol Chem* **275**(47): 36839-46.
- de Groot, B. L., T. Frigato, et al. (2003). "The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel." *J Mol Biol* **333**(2): 279-93.
- de Groot, B. L. and H. Grubmuller (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." *Science* **294**(5550): 2353-7.
- de Mattia, F., P. J. Savelkoul, et al. (2005). "Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." *J Am Soc Nephrol* **16**(10): 2872-80.
- Deen, P. M., H. Croes, et al. (1995). "Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing." *J Clin Invest* **95**(5): 2291-6.
- Deen, P. M., D. O. Weghuis, et al. (1994). "Assignment of the human gene for the water channel of renal collecting duct Aquaporin 2 (AQP2) to chromosome 12 region q12-->q13." *Cytogenet Cell Genet* **66**(4): 260-2.
- Dingwall, C., S. V. Sharnick, et al. (1982). "A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus." *Cell* **30**(2): 449-58.
- Dodier, Y., U. Banderali, et al. (2004). "Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis." *J Biol Chem* **279**(8): 6853-62.
- Donaldson, Z. R. and L. J. Young (2008). "Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality." *Science* **322**(5903): 900-4.
- Echevarria, M., E. E. Windhager, et al. (1994). "Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10997-1001.
- Endeward, V., J. P. Cartron, et al. (2008). "RhAG protein of the Rhesus complex is a  $\text{CO}_2$  channel in the human red cell membrane." *Faseb J* **22**(1): 64-73.
- Ferraris, J. D. and M. B. Burg (2006). "Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in Mammalian cells." *Contrib Nephrol* **152**: 125-41.
- Frokiaer, J., D. Marples, et al. (1996). "Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney." *Am J Physiol* **270**(4 Pt 2): F657-68.
- Fu, D., A. Libson, et al. (2000). "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity." *Science* **290**(5491): 481-6.
- Funaki, H., T. Yamamoto, et al. (1998). "Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells." *Am J Physiol* **275**(4 Pt 1): C1151-7.

- Gagnon, D. G., P. Bissonnette, et al. (2006). "Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter." *J Gen Physiol* **127**(2): 145-58.
- Goji, K., M. Kuwahara, et al. (1998). "Novel mutations in aquaporin-2 gene in female siblings with nephrogenic diabetes insipidus: evidence of disrupted water channel function." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(9): 3205-9.
- Gorelick, D. A., J. Praetorius, et al. (2006). "Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain." *BMC Biochem* **7**: 14.
- Gouraud, S., A. Laera, et al. (2002). "Functional involvement of VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells." *J Cell Sci* **115**(Pt 18): 3667-74.
- Gurdon, J. B. (1960). "The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*." *J Embryol Exp Morphol* **8**: 505-26.
- Gurdon, J. B. (1970). "Nuclear transplantation and the control of gene activity in animal development." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **176**(44): 303-14.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, et al. (1971). "Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells." *Nature* **233**(5316): 177-82.
- Gurdon, J. B. and D. A. Melton (1981). "Gene transfer in amphibian eggs and oocytes." *Annu Rev Genet* **15**: 189-218.
- Guyon, C., Y. Lussier, et al. (2009). "Characterization of D150e and G196d Aquaporin-2 Mutations Responsible of Nephrogenic Diabetes Insipidus; Importance of a Mild Phenotype." *Am J Physiol Renal Physiol*.
- Hamann, S., T. Zeuthen, et al. (1998). "Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 1): C1332-45.
- Hasler, U., S. Nielsen, et al. (2006). "Posttranscriptional control of aquaporin-2 abundance by vasopressin in renal collecting duct principal cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(1): F177-87.
- Hatakeyama, S., Y. Yoshida, et al. (2001). "Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum." *Biochem Biophys Res Commun* **287**(4): 814-9.
- Hebert, T. E., S. Moffett, et al. (1996). "A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation." *J Biol Chem* **271**(27): 16384-92.
- Hendriks, G., M. Koudijs, et al. (2004). "Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **279**(4): 2975-83.
- Henn, V., E. Stefan, et al. (2005). "Compartmentalized cAMP signalling regulates vasopressin-mediated water reabsorption by controlling aquaporin-2." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1316-8.



- Hirano, K., C. Zuber, et al. (2003). "The proteasome is involved in the degradation of different aquaporin-2 mutants causing nephrogenic diabetes insipidus." Am J Pathol **163**(1): 111-20.
- Hochberg, Z., A. Van Lieburg, et al. (1997). "Autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin-2 mutation." J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 686-9.
- Hoffert, J. D., T. Pisitkun, et al. (2006). "Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7159-64.
- Innamorati, G., C. Le Gouill, et al. (2001). "The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors." J Biol Chem **276**(16): 13096-103.
- Innamorati, G., H. Sadeghi, et al. (1999). "Phosphorylation and recycling kinetics of G protein-coupled receptors." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 315-26.
- Iolascon, A., V. Aglio, et al. (2007). "Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus." Nephron Physiol **105**(3): p33-41.
- Ishibashi, K., M. Kuwahara, et al. (1997). "Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea." J Biol Chem **272**(33): 20782-6.
- Ishibashi, K., M. Kuwahara, et al. (1998). "Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol." Biochem Biophys Res Commun **244**(1): 268-74.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6269-73.
- Itoh, T., T. Rai, et al. (2005). "Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 832-8.
- Jung, J. S., G. M. Preston, et al. (1994). "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." J Biol Chem **269**(20): 14648-54.
- Kamsteeg, E. J., D. G. Bichet, et al. (2003). "Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus." J Cell Biol **163**(5): 1099-109.
- Kamsteeg, E. J. and P. M. Deen (2000). "Importance of aquaporin-2 expression levels in genotype -phenotype studies in nephrogenic diabetes insipidus." Am J Physiol Renal Physiol **279**(4): F778-84.
- Kamsteeg, E. J. and P. M. Deen (2001). "Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity." Biochem Biophys Res Commun **282**(3): 683-90.

- Kamsteeg, E. J., G. Hendriks, et al. (2006). "Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18344-9.
- Kamsteeg, E. J., T. A. Wormhoudt, et al. (1999). "An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." Embo J **18**(9): 2394-400.
- Kang, G., J. W. Joseph, et al. (2003). "Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and exocytosis in pancreatic beta-cells." J Biol Chem **278**(10): 8279-85.
- Katsura, T., C. E. Gustafson, et al. (1997). "Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells." Am J Physiol **272**(6 Pt 2): F817-22.
- Kishida, K., H. Kuriyama, et al. (2000). "Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes." J Biol Chem **275**(27): 20896-902.
- Koyama, N., K. Ishibashi, et al. (1998). "Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene." Genomics **54**(1): 169-72.
- Koyama, Y., T. Yamamoto, et al. (1997). "Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver." J Biol Chem **272**(48): 30329-33.
- Koyama, Y., T. Yamamoto, et al. (1999). "Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): C621-7.
- Kozono, D., M. Yasui, et al. (2002). "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine." J Clin Invest **109**(11): 1395-9.
- Krieg, P., R. Strachan, et al. (1984). "Efficient expression of cloned complementary DNAs for secretory proteins after injection into *Xenopus* oocytes." J Mol Biol **180**(3): 615-43.
- Kuwahara, M. (1998). "Aquaporin-2, a vasopressin-sensitive water channel, and nephrogenic diabetes insipidus." Intern Med **37**(2): 215-7.
- Kuwahara, M., K. Fushimi, et al. (1995). "cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **270**(18): 10384-7.
- Kuwahara, M., K. Iwai, et al. (2001). "Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus." Am J Hum Genet **69**(4): 738-48.
- Kuznetsov, G. and S. K. Nigam (1998). "Folding of secretory and membrane proteins." N Engl J Med **339**(23): 1688-95.
- Lin, S. H., D. G. Bichet, et al. (2002). "Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2694-700.

- Lussier, Y., P. Bissonnette, et al. (2005). Effects of Myo-Inositol on Rescue of AQP2 Mutants in Xenopus Oocytes. The American Society of Nephrology - Renal Week 2005, Philadelphia, PA, USA.
- Ma, T., A. Frigeri, et al. (1993). "Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels." Biochem Biophys Res Commun **197**(2): 654-9.
- Ma, T., M. Hara, et al. (2002). "Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3." J Biol Chem **277**(19): 17147-53.
- Ma, T., B. Yang, et al. (1996). "cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13." Genomics **35**(3): 543-50.
- Madziva, M. T. and M. Birnbaumer (2006). "A role for ADP-ribosylation factor 6 in the processing of G-protein-coupled receptors." J Biol Chem **281**(17): 12178-86.
- Marples, D., S. Christensen, et al. (1995). "Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla." J Clin Invest **95**(4): 1838-45.
- Marples, D., J. Frokiaer, et al. (1996). "Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex." J Clin Invest **97**(8): 1960-8.
- Marples, D., J. Frokiaer, et al. (1999). "Long-term regulation of aquaporins in the kidney." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): F331-9.
- Marr, N., D. G. Bichet, et al. (2002). "Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **13**(9): 2267-77.
- Marr, N., D. G. Bichet, et al. (2002). "Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." Hum Mol Genet **11**(7): 779-89.
- Morello, J. P. and D. G. Bichet (2001). "Nephrogenic diabetes insipidus." Annu Rev Physiol **63**: 607-30.
- Morello, J. P., A. Salahpour, et al. (2000). "Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants." J Clin Invest **105**(7): 887-95.
- Morishita, Y., T. Matsuzaki, et al. (2005). "Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule." Mol Cell Biol **25**(17): 7770-9.
- Mukhopadhyay, D. and H. Riezman (2007). "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling." Science **315**(5809): 201-5.
- Mulders, S. M., D. G. Bichet, et al. (1998). "An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex." J Clin Invest **102**(1): 57-66.

- Mulders, S. M., N. V. Knoers, et al. (1997). "New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels." J Am Soc Nephrol **8**(2): 242-8.
- Mulders, S. M., A. F. van Lieburg, et al. (1996). "Physiology and pathophysiology of aquaporins." Eur J Clin Invest **26**(12): 1041-50.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature **407**(6804): 599-605.
- Nagase, H., J. Agren, et al. (2007). "Molecular cloning and characterization of mouse aquaporin 6." Biochem Biophys Res Commun **352**(1): 12-6.
- Nielsen, S., L. S. King, et al. (1997). "Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): C1549-61.
- Nielsen, S., T. H. Kwon, et al. (1999). "Physiology and pathophysiology of renal aquaporins." J Am Soc Nephrol **10**(3): 647-63.
- Noda, Y., S. Horikawa, et al. (2004). "Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA-1." FEBS Lett **568**(1-3): 139-45.
- O'Callaghan, C. A. and C. A. O'Callaghan (2006). The renal system at a glance. Malden, Mass. ; Oxford, Blackwell.
- Oksche, A., A. Moller, et al. (1996). "Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor genes in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus." Hum Genet **98**(5): 587-9.
- Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2007). "Aquaporin-4 and brain edema." Pediatr Nephrol **22**(6): 778-84.
- Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-73.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science **256**(5055): 385-7.
- Raina, S., G. M. Preston, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues." J Biol Chem **270**(4): 1908-12.
- Richter, H. P. (1980). "SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of isolated cortices of *Xenopus laevis* eggs." Cell Biol Int Rep **4**(11): 985-95.
- Robben, J. H., N. V. Knoers, et al. (2006). "Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus." Am J Physiol Renal Physiol **291**(2): F257-70.
- Rojek, A. M., M. T. Skowronski, et al. (2007). "Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3609-14.
- Rubinstein, D. C. (2003). "How does the Huntington's disease mutation damage cells?" Sci Aging Knowledge Environ **2003**(37): PE26.
- Sardet, C., F. Prodon, et al. (2002). "Structure and function of the egg cortex from oogenesis through fertilization." Dev Biol **241**(1): 1-23.

- Sasaki, S. and Y. Noda (2007). "Aquaporin-2 protein dynamics within the cell." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(4): 348-52.
- Schrier, R. W. and M. A. Cadnapaphornchai (2003). "Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease." Prog Biophys Mol Biol **81**(2): 117-31.
- Shi, P. P., X. R. Cao, et al. (2007). "Nephrogenic diabetes insipidus in mice caused by deleting COOH-terminal tail of aquaporin-2." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1334-44.
- Simon, H., Y. Gao, et al. (1993). "Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **265**(3 Pt 1): C757-62.
- Tajika, Y., T. Matsuzaki, et al. (2005). "Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments." Histochem Cell Biol **124**(1): 1-12.
- Tajkhorshid, E., P. Nollert, et al. (2002). "Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning." Science **296**(5567): 525-30.
- Takata, K., T. Matsuzaki, et al. (2004). "Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane." Prog Histochem Cytochem **39**(1): 1-83.
- Tamarappoo, B. K. and A. S. Verkman (1998). "Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones." J Clin Invest **101**(10): 2257-67.
- Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiol Rev **84**(1): 137-67.
- Thibonnier, M., P. Coles, et al. (2001). "The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 175-202.
- Tsukaguchi, H., C. Shayakul, et al. (1998). "Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel." J Biol Chem **273**(38): 24737-43.
- Umenishi, F., T. Narikiyo, et al. (2006). "cAMP regulates vasopressin-induced AQP2 expression via protein kinase A-independent pathway." Biochim Biophys Acta **1758**(8): 1100-5.
- van Lieburg, A. F., M. A. Verdijk, et al. (1994). "Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene." Am J Hum Genet **55**(4): 648-52.
- Vargas-Poussou, R., L. Forestier, et al. (1997). "Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **8**(12): 1855-62.
- Verkman, A. S., M. Hara-Chikuma, et al. (2008). "Aquaporins--new players in cancer biology." J Mol Med **86**(5): 523-9.
- Verkman, A. S., J. Ruiz-Ederra, et al. (2008). "Functions of aquaporins in the eye." Prog Retin Eye Res **27**(4): 420-33.
- Voet, D., Voet, JG (1995). Biochemistry, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.

- Wall, D. A. and S. Patel (1989). "Isolation of plasma membrane complexes from *Xenopus* oocytes." J Membr Biol **107**(2): 189-201.
- Wallace, R. A., T. Ho, et al. (1973). "Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. IV. The role of follicle cells and calcium during protein uptake." Exp Cell Res **82**(2): 287-95.
- Wang, W., P. S. Hart, et al. (2003). "Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues." Calcif Tissue Int **72**(3): 222-7.
- Welch, W. J. and C. R. Brown (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperones **1**(2): 109-15.
- Whibley, C., P. D. Pharoah, et al. (2009). "p53 polymorphisms: cancer implications." Nat Rev Cancer **9**(2): 95-107.
- Yakata, K., Y. Hiroaki, et al. (2007). "Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity." Biochim Biophys Acta **1768**(3): 688-93.
- Yang, B. and A. S. Verkman (1997). "Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **272**(26): 16140-6.
- Yip, K. P. (2006). "Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **291**(4): F882-90.
- Zaki, M., T. Schoneberg, et al. (2006). "Nephrogenic diabetes insipidus, thiazide treatment and renal cell carcinoma." Nephrol Dial Transplant **21**(4): 1082-6.
- Zeidel, M. L., S. V. Ambudkar, et al. (1992). "Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein." Biochemistry **31**(33): 7436-40.